

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ch. Nimsky  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# Nicht-fluoreszenz-basierte Konfokale EndoMikroskopie in der Neurochirurgie: ein intraoperatives Hilfsmittel für die Tumorklassifikation und Resektionskontrolle?

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin  
dem  
Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
Johanna Schodrowski  
aus Danzig  
Marburg an der Lahn, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
06.05.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. H. Schäfer

**Referent:** Prof. Dr. Ch. Nimsky

**Korreferent:** PD Dr. E. Heinmöller

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca	Karzinom
CLEM	Konfokale EndoMikroskopie (Confocal Laserendomicroscopy)
CT	Computertomographie
dpt	Dioptrien
DTI	Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (Diffusion Tensor Imaging)
EvG	Elastica van Gieson
FITC- Dextran	Fluoreszein-Isothiocyanate
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GBM	Glioblastom (Glioblastoma multiforme)
GS	Gordon-Sweets
HE	Hämatoxylin-Eosin
iMRT	Intraoperative Magnetresonanztomographie
i.v.	intravenös
KM	Kontrastmittel
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
PXA	Pleomorphes Xanthoastrozytom
SD	Standardabweichung
Vergr.	Vergrößerung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

## **Abstract**

### **Objective**

Extent of tumor resection and histopathological diagnosis influence survival time and outcome in patients with brain tumors [35]. Recently a couple of studies were published that showed the potential of confocal microscopy using fluorescence to detect tumor in and ex vivo [7, 42, 44]. To establish an intraoperative technique to differentiate between tumor and healthy tissue we used confocal laserendomicroscopy (CLEM; Storz: Tuttlingen, Germany) without fluorescence in tumor samples of patients.

### **Methods**

Tumor samples of glioblastoma WHO°IV (n=11), meningioma WHO°I, II (n=12), metastases (n=3), oligoastrocytoma WHO°III (n=2), cavernom (n=2), oligoastrocytoma WHO°II (n=1), pleomorphic xanthoastrocytoma WHO°II (n=1), oligodendroglioma WHO°III (n=1), hemangiopericytoma WHO°II (n=1) and haemangioblastoma WHO°I-II (n=1) were examined. Before samples were analysed by conventional histopathology CLEM was used to examine tumor samples ex vivo but immediately after resection. At least 100 images of each sample were collected with a lateral resolution of 2 µm and a field of view of 300x300 µm. CLEM and histological images of each tumor were collated. In addition CLEM was also performed on fresh mouse brain. Images of cerebral cortex, white matter, corpus callosum and cerebellum were collected and compared with conventional histological images.

### **Results**

In patients with high grade glioma and metastases normal brain tissue, infiltration zone, vital tumor cells and necrosis were detected reproducible using CLEM. WHO criteria such as cell density, microvascular proliferation and necrosis could be visualized. A differentiation of metastases vs. glioblastoma was problematic but the differentiation to normal brain tissue was obvious. Collagen patterns, calcifications and/or psammoma bodies were represented consistently in meningeoma and correlated to conventional histopathology. Images of murine cerebellum showed typical features such as molecular layer, purkinje cell layer and granule cell layer. Neural tracts in corpus callosum and white matter as well as typical aspects of cortex were identified.

### **Discussion**

Non-fluorescence CLEM facilitates a distinction of brain structures as well as tumor tissues. Thus it is possible to detect infiltrative brain tumor margins and characteristics like cell density during surgery. Since no contrast media (fluorescence) is required using this technique in vivo is very easy. It may help to get intraoperative rapid section diagnosis more simply and to make a decision about operative strategies just as to make sure all pathological tissue is removed.



# Inhalt

I	Einleitung .....	1
I.1	Hirntumore: Einteilung und Histologie .....	1
I.2	Wichtige Faktoren für die Prognose und Therapie der Hirntumore .....	3
I.3	Fragestellung .....	7
II	Materialien und Methoden .....	8
II.1	Das konfokale EndoMikroskop .....	8
II.2	Bilderzeugung .....	9
II.3	Untersuchtes Maushirn .....	12
II.4	Patientenkollektiv .....	13
II.5	Untersuchungsablauf und Methode .....	14
III	Ergebnisse .....	16
III.1	Typische Artefakte .....	16
III.2	Das Referenzgewebe der Maus .....	17
III.2.1	Kleinhirn .....	17
III.2.2	Großhirn .....	20
III.3	Das Tumorgewebe .....	25
III.3.1	Meningeom .....	28
III.3.2	Glioblastom .....	32
III.3.3	Andere Gliome .....	39
III.3.4	Hämangioperizytom .....	44
III.3.5	Kavernom .....	46
III.3.6	Metastasen .....	47
III.4	Verblindete Analyse .....	48
IV	Diskussion .....	49
V	Literaturverzeichnis .....	56
VI	Abbildungsverzeichnis .....	59
VII	Tabellenverzeichnis .....	59
VIII	Persönlicher Anhang .....	60
VIII.1	Akademische Lehrer .....	60
VIII.2	Danksagung .....	62
VIII.3	Publikationen .....	63

# **I Einleitung**

## **I.1 Hirntumore: Einteilung und Histologie**

Intrakranielle Tumore werden nach ihrer zytogenetischen Herkunft und ihrem Wachstumsmuster klassifiziert [25]. Zum einen werden primäre hirneigene Tumore, die von Nervenzellen oder Stützgewebe (Glia) hervorgehen, von den primären nicht-hirneigenen Tumoren, die von Hirnhäuten, weiteren Hirnanhangsgebilden, hirnversorgenden Gefäßen oder dem Plexus choroideus hervorgehen [21], unterschieden. Zum anderen werden sekundär entstandene Hirnmetastasen, deren Primarius extrakraniell liegt, gesondert eingeteilt. Zu den häufigsten Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) gehören die malignen Gliome und Hirnmetastasen [5].

Primäre Hirntumore werden mit Hilfe der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Klassifikation in eine vier-stufige Graduierungsskala eingeteilt, die eine Malignitätsskala beinhaltet. Diese histologische Einstufung bewertet das biologische Verhalten eines Tumors und spielt eine große Rolle im klinischen Alltag zur weiteren Therapieplanung [21]. Der WHO Grad ist zusammen mit anderen klinischen Kriterien wie dem Alter des Patienten, dem neurologischen Status, gemessen am Karnofsky-Aktivitätsindex, der Tumorlokalisation, radiologischer Kriterien wie der Kontrastmittelanreicherung und dem Ausmaß der chirurgischen Resektion entscheidend für die Überlebenszeit und damit die Prognose des Patienten [21].

Gliome sind neuroepitheliale Tumore. Zu den häufigsten Gliomen gehören Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome und gemischte Gliome [5]. Sie lassen sich in niedrig- und hochmaligne Gliome, unter Berücksichtigung der WHO-Klassifikation, einteilen [21]. Zu den niedrigmalignen Gliomen gehören Tumore mit dem biologischen Verhalten WHO Grad I oder II, zu den hochmalignen Gliomen Tumore mit dem biologischen Verhalten WHO Grad III und IV. Unter den Astrozytomen ist das Glioblastom (Glioblastoma multiforme, GBM) WHO Grad IV besonders hervorzuheben, welches einen Anteil von über 30 % der ZNS-Tumore ausmacht [43]. Es werden primäre und sekundäre Glioblastome unterschieden. Das primäre GBM entsteht de novo und ist sehr schnell wachsend. Es betrifft hauptsächlich Patienten mit einem mittleren Alter von 55 Jahren. Das sekundäre GBM hingegen weist eine langsamere Entwicklung durch maligne Progression vom diffusen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) auf. Oft sind jüngere Patienten im Alter von 40 Jahren betroffen [15]. Diffuse und anaplastische Gliome

haben eine schlechte Prognose, da sie aufgrund der Tendenz zu malignisieren früher oder später alle in ein Glioblastom übergehen. Aktuell hat das Glioblastom eine schlechte Prognose mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 2,7 % in Europa [43]. Eine Ausnahme unter den Gliomen bildet das pilozytische Astrozytom WHO Grad I, welches aus biologischen und klinisch- prognostischen Gründen von den übrigen Gliomen abgegrenzt wird [25]. Es tritt hauptsächlich im Kindes- und Jugendalter auf und hat eine fünf-Jahres-Überlebensrate von über 80 % [43]. Gliome metastasieren sehr selten [45].

Gliome weisen eine starke Neovaskularisation auf, die nicht nur für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Tumore entscheidend ist, sondern auch für die Durchlässigkeit der Gefäße und Störung der Bluthirnschranke (BHS) [1]. Dies führt zu einer Ausbildung eines Ödems, welches i. d. R. umso stärker ausgeprägt ist, je maligner der Tumor ist, und zu einer Migration von Tumorzellen [1, 25]. So können die Tumorzellen in weit entfernte Hirnareale gelangen. Daher spricht man von einem diffus infiltrierenden Zellwachstum der Gliome [25]. Das Glioblastom weist vor allem im Tumorzentrum Tumornekrose auf. Es werden zwei unterschiedliche Nekrosetypen unterschieden. Zum einen die großflächige oft ischämische Nekrose, zum anderen die strichförmige Nekrose, die ein Pseudopalisadenmuster bildet, die beide typisch für das GBM sind. Hierbei handelt es sich um multiple, bandartige Herde, umgeben von radiär orientierten, dicht gepackten Gliomzellen. Diese Nekroseart kommt sowohl im primären wie auch im sekundären GBM vor. Ein weiteres Merkmal sind die Gefäßproliferate. Diese können sehr ausgeprägt sein und „girlandenartig“ imponieren. Sie bestehen aus vielschichtigen, mitotisch aktiven Endothelzellen mit glatten Muskelzellen. Gefäßthrombosen treten häufig auf und können eine Rolle in der Pathogenese ischämischer Tumornekrose spielen. Die übrigen Gliome bilden keine Sekundärstrukturen aus.

Das Pleomorphe Xanthoastrozytom (PXA) ist zusammengesetzt aus fibrillären, riesigen, oft multinukleären neoplastischen Astrozyten, sodass ein sehr buntes Zellbild entsteht. Im Gegensatz zum GBM ist das PXA jedoch nicht maligne. Die Unterscheidung zwischen diesen Tumoren ist einerseits prognostisch und ggf. bezüglich der operativen Strategie wesentlich. Mikrokalzifikationen, mukoide und zystische Degenerationen sind charakteristisch für das Oligodendrogliom [16].

Das Meningeom ist der häufigste primäre nicht-gliale Tumor und der zweithäufigste intrakranielle Tumor nach dem Glioblastom mit einem Anteil von 21,6 % bei den nicht-epithelialen Tumoren. Die fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei 88,7 % für Europa [43]. Am häufigsten sind Meningeome vom WHO Grad I, die einen Anteil von 68,9 % ausmachen. Die atypischen Meningeome WHO Grad II finden sich in 30,1 % der Fälle

und anaplastische Meningeome WHO Grad III sind mit einem Anteil von 1 % sehr selten [2]. Nach histologischer Typenvielfalt werden die Meningeome WHO Grad I weiter aufgeteilt in meningotheliales, fibröses, psammomatöses, angiomatöses, mikrozystisches und Transitionalzell- Meningeom [16]. Sie bestehen aus neoplastischen meningothelialen Zellen. Meningeome gehen von den Deckzellen der Arachnoidea aus und haften an der Dura mater an, die sie zapfenartig infiltrieren können. Zu den histologischen Merkmalen gehören Zug- und Wirbelformationen, die Ausbildung von Retikulinfaserbündeln und konzentrische Kalkablagerungen, die sogenannten Psammomkörper. Diese sind typischerweise beim psammomatösen und Transitionalzell- Meningeom zu finden.

Hirnmetastasen haben eine Inzidenz von 9,6%. Zu den häufigsten primären Tumoren, die in das Gehirn metastasieren, gehören das maligne Melanom, das Bronchialkarzinom sowie das Mammakarzinom. Sie sind verantwortlich für 67% bis 80% der Hirnmetastasen [26]. Viele Chemotherapeutika können die BHS nicht überwinden, sodass Patienten trotz wirksamer extrakranieller Tumorthapie Hirnmetastasen entwickeln können [13]. Bei Patienten mit Hirnmetastasen, die mit einer Ganzhirnbestrahlung behandelt wurden, liegt das mediane Überleben bei vier bis sieben Monaten. Die Histologie der Hirnmetastasen richtet sich nach dem Primarius. Sie bilden häufig Gefäßproliferate und Nekrosen aus. Die Tumorzellverbände sind scharf und meist bindegewebig vom Hirngewebe abgegrenzt, solide, gelegentlich zystisch [16]. Sie unterscheiden sich i. d. R. vom Invasionsmuster der Gliome [25].

## I.2 Wichtige Faktoren für die Prognose und Therapie der Hirntumore

Eine entscheidende Rolle für die Prognose und das Langzeitüberleben der Patienten ist neben dem Karnofsky Index das Patientenalter [28]. Patienten unter 65 Jahre haben einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten über 65 Jahren mit Glioblastom [18]. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Prognose ist der O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) Status, der wichtig für die Therapie ist. Das MGMT-Gen codiert für ein gleichnamiges DNS-Reparaturprotein, welches Alkylgruppen von der Position O6 des Guanins der DNS entfernt. Die Wirkung einiger Chemotherapeutika (z.B. Temozolomid) beruht auf Anfügen von Alkylgruppen an diese Position O6. Zytotoxizität und Apoptose der Tumorzellen sind die Folge. Wird das MGMT-Gen überexprimiert kommt es zu einer verringerten Wirkung der Chemotherapeutika. Durch Promoter-Hypermethylierung wird dieses Gen stillgelegt. Es konnte bei Patienten mit Glioblastom gezeigt werden, dass ein verbessertes Ansprechen bei Patienten mit

MGMT-Promoter Methylierung auf Radiochemotherapie bestand [55]. Zur weiteren Routinediagnostik in der Immunhistochemie gehört die Bestimmung von Punktmutationen in für eine Isocitrat-Dehydrogenase kodierendes IDH 1- und IDH 2 Gen. Diese Mutationen treten bei über 70% der primären astrozytären, oligodendroglialen und oligoastrozytären Tumoren, sowie sekundären GBM auf. Diese Mutation korreliert mit einer besseren Prognose und dient als differentialdiagnostisches Kriterium zum primären GBM [4, 57]. Im Gegensatz dazu dienen weder Geschlecht, Lokalisation, noch Primärläsion oder Rezidiv als prognostische Faktoren bei Patienten mit Glioblastom [18].

Die Therapie der ZNS Tumore erfolgt interdisziplinär und beinhaltet die möglichst vollständige mikrochirurgische Resektion mit anschließender adjuvanter Bestrahlung und Chemotherapie. Die histopathologische Diagnose hat nicht nur für die Prognose des Patienten eine besondere Bedeutung, sondern auch für die Therapieplanung. So unterscheidet sich die Therapie der Lymphome erheblich zu anderen Hirntumoren. Statt der Resektion ist die Therapie der Wahl die Chemotherapie [3]. Bildmorphologisch kann die Differenzierung zu Tumoren, Lymphomen, Entzündungen und Infarkten gegebenenfalls erschwert sein, sodass die Biopsie mit histologischer Beurteilung essentiell ist.

Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, der Lokalisation wichtigster Funktionen auf engstem Raum und der hohen Vulnerabilität des Hirngewebes unterscheidet sich das chirurgische Vorgehen bei Hirntumoren wesentlich im Vergleich zu anderen operativen Tumorbehandlungen. Oftmals muss initial eine Massenreduktion innerhalb des Tumors vorgenommen werden, insbesondere bei großen Raumforderungen. Anschließend wird i. d. R., sofern die Lokalisation dies zulässt, entlang der Tumorgrenzen präpariert. Eine weitere Besonderheit ist, dass insbesondere in der Gliomchirurgie der Übergang zwischen gesundem Hirn und Tumor mit bloßem Auge trotz Operationsmikroskop häufig nicht sicher abgrenzbar ist. Im Gegensatz zu Metastasen und Meningeomen ist eine totale Resektion von Gliomen aufgrund der diffusen Infiltration des Hirnparenchyms praktisch nicht möglich. Ausgehend von nicht resezierten Tumorzellen kann es zum Rezidiv kommen und es besteht die Gefahr der progressiven Malignisierung der diffusen und anaplastischen Astrozytomen. Meningeome und Metastasen lassen sich klarer resezieren, allerdings kann es hier ebenfalls erschwert sein Tumorgrenzen zu bestimmen. Gleichzeitig sollte die Schonung eloquenter Hirnareale oberste Priorität besitzen, um möglichst keine neuen postoperativen neurologischen Defizite hervorzurufen. Das Resektionsausmaß spielt bei der Behandlung eine besondere Rolle. Die möglichst ausgedehnte Tumorsektion ist ein Prädiktor der zu erwartenden Überlebenszeit bei Patienten mit Gliomen oder

Metastasen [39]. Eine Tumormassenreduktion bei Patienten mit GBM von 98 % oder mehr führt zu einem signifikanten Überlebensvorteil mit Verlängerung der Überlebenszeit von 8,8 Monaten auf 13 Monate, sowie einer Ausdehnung des rezidivfreien Intervalls [18, 19]. Neben einer Verbesserung des Gesamtüberlebens, kann das Risiko der malignen Transformation von niedrigmalignen Gliome positiv beeinflusst werden [20, 38, 40].

Die Therapieoptionen der Metastasen richten sich sowohl nach Primarius, als auch der Anzahl und Lokalisation der Metastasen. Möglichkeiten sind die chirurgische Resektion, die Ganzhirnbestrahlung, die stereotaktische Radiochirurgie und die Chemotherapie. Diese Verfahren können sowohl isoliert als auch kombiniert angewendet werden [6] und müssen für jeden Patienten individuell entschieden werden [13].

Chirurgisch gestaltet sich die Bestimmung der Tumorgrenzen für den Operateur häufig als äußerst schwierig. Kontrollierende intraoperative Bildgebung kann den Operateur unterstützen, indem das Resektionsausmaß verbessert wird ohne dem Patienten zu schaden. Mit Hilfe intraoperativer Magnetresonanztomographie (iMRT) ist die Rate einer ausgedehnten Tumorresektion, d. h. kein Tumor im MRT mehr nachweisbar, höher als in der Kontrollgruppe ohne Unterschiede im neurologischen Status [47]. Die subjektive Einschätzung des Operateurs über das Ausmaß der Tumorresektion bei Gliomen stimmt oft nicht mit der kontrollierenden Bildgebung überein [29].

Für den Neurochirurgen ergeben sich demzufolge zwei wesentliche Herausforderungen. Es gilt eine maximale Tumorresektion anzustreben, ohne dabei neue neurologische Defizite zu verursachen.

Die intraoperative Bildgebung hat in der letzten Dekade zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Operateur ist in der Lage operative Strategien zu modifizieren und Tumorreste von inkompletten Resektionen unmittelbar intraoperativ zu erkennen und zu entfernen, sodass eine objektive Messung und Qualitätskontrolle möglich ist [28, 31]. Zu den heutzutage angewandten Methoden der intraoperativen Bildgebung gehören das intraoperative MRT, Computertomographie (CT), Ultraschall und die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) mithilfe des Operationsmikroskops.

Die Neuronavigation ist eine Standardmethode mit deren Hilfe multimodale Bildgebung wie funktionelles MRT (fMRT) und Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) in 3D-Rekonstruktion, um den Tumor zielsicher zu identifizieren und dabei eloquente Gehirnstrukturen zu schützen [28]. Limitiert wird der sichere Einsatz der Neuronavigation durch den Brain Shift [30, 46]. Es ist wichtig, intraoperativ die

anatomischen Verhältnisse mittels Bildgebung zu überprüfen, um die Neuronavigation zu aktualisieren und die operativen Strategien anzupassen. Die sicherste Methode mit der höchsten Auflösung stellt hierfür das intraoperative MRT dar [31]. Es können anatomische Details und Informationen zu Ödemen, intratumoraler Blutung, Nekrose, Verkalkung, Vaskularisation, Zeichen des intrakraniellen Druckanstiegs, sowie zum Grad und Muster der Kontrastmittelaufnahme gut beurteilt werden. Das MRT ist sowohl zur Diagnosestellung, der Operationsplanung, der Bestimmung des Resektionsausmaßes während und nach der Operation, als auch zur weiteren Therapieplanung essentiell [27]. Dieses Verfahren ist an wenigen Zentren möglich, die Operationszeit verlängert sich unter Umständen deutlich und es ist mit hohen personellem und logistischem Aufwand sowie hohen Kosten verbunden [19].

Ultraschall ist eine einfach anwendbare, verbreitete Methode, die die Neuronavigation unterstützen kann, um Tumore darzustellen [24, 32, 50]. Mit dem Ultraschall ist eine Echtzeit Bildgebung der anatomischen Gegebenheiten möglich. Es ist eine günstigere und schnellere Methode als das MRT. Durch chirurgische Resektionsräume können jedoch Artefakte entstehen, die zu einer Beeinträchtigung der Ultraschall Bildqualität führen [50]. Es kann nicht immer exakt zwischen tumorösen und ödematösen Gewebe differenziert werden [24].

5-ALA ist eine Aminosäure, die im Gewebe die Synthese und Akkumulation des Fluoreszenz-Moleküls Protoporphyrin IX in den Mitochondrien bewirkt, die in metabolisch sehr aktiven Zellen, also Tumorzellen angereichert wird [51, 56]. Im Operationsmikroskop wird die Fluoreszenz des Protoporphyrin durch blau-violettes Licht sichtbar gemacht [17, 19, 53]. Durch die Visualisierung der Tumoreareale kann eine verbesserte Resektion erreicht werden [51]. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Gliome erst ab einem WHO Grad III, sowie Tumorzellen mit einer erhöhten metabolischen und zellproliferierenden Aktivität fluoreszieren. Niedriggradig maligne Gliome können mit dieser Methode nicht ausreichend visualisiert werden [56]. 5-ALA besitzt eine geringe Spezifität [54]. Eine falsch-positive 5-ALA Aufnahme des Gewebes wurde bei Strahlennekrose, neurodegenerativen Erkrankungen, peritumoralen Ödem und inflammatorischen Reaktionen des Gewebes beobachtet [33, 54]. Hinzukommt, dass eine hohe präoperative Kortikosteroidgabe, die oftmals notwendig ist, zu einer reduzierten 5-ALA Aufnahme im malignen Gewebe führt [56]. Für den Operateur erweist sich daher sowohl die Interpretation der Fluoreszenz als auch die Bestimmung des Resektionsausmaßes als Schwierigkeit. Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Tachykardie, Hypotonie, eine Erhöhung der Leberenzyme sowie eine erhöhte Photosensibilität der Haut stellen zudem einen weiteren Nachteil dar [17, 33].

Zuletzt wurde die in anderen medizinischen Fachbereichen (Gastroenterologie, Ophthalmologie) [10, 11, 36, 48] bereits etablierte Fluoreszenzmarker gestützte konfokale EndoMikroskopie experimentell zur Darstellung von Tumoren in Mausmodellen, ex situ bei Patienten mit GBM, in situ in niedriggradigen Gliomen und in anderen Hirntumoren angewandt [9, 12, 23, 34, 41, 42, 44]. In diesen Studien gelang es zum einen graue und weiße Substanz, zum anderen aber auch Tumorzellen, typische Tumorstrukturen und Infiltrationszonen darzustellen. Die Methode ist einfach anzuwenden, und rekrutiert überschaubare finanzielle und personelle Mittel. Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit eines Markers, der in den Studien entweder topisch oder intravenös verabreicht wurde. Zudem ist eine suffiziente in situ Anwendung beim Menschen bisher nicht beschrieben worden. Mit der topischen Gabe von Acriflavin Hydrochlorid ex vivo auf den Tumor gelang es die oberflächliche Zellschicht darzustellen, tiefere Schichten mussten neu eingefärbt werden [44]. Mit der Applikation von Fluoreszein i. v. in vivo bei Patienten und in Mausmodellen zeigen sich Blutfluss, Gefäße und Kapillaren [7, 9, 42]. Die Tumorgrenzen wurden dort festgelegt, wo keine oder wenig Fluoreszein Aufnahme bestand. Es konnte zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten unterschieden werden, nukleäre Details waren jedoch sehr schwer zu erkennen [7]. Bei der intravenösen Gabe muss der Fluoreszenzmarker die BHS überwinden. Problematisch ist, dass viele Fluorophore, die beispielsweise im Gastrointestinaltrakt zur Anwendung kommen, mutagen sind und für die Verwendung im Gehirn nicht zugelassen sind [23].

Neuere technische Entwicklungen im Bereich der konfokalen Mikroskopie erlauben den Verzicht eines Fluoreszenzmarkers. Die Bilderzeugung bei der konfokalen Mikroskopie und damit auch Endomikroskopie beruht auf Reflexion, Absorption und Streuung der unterschiedlichen Brechungsindizes der Gewebestrukturen. Idee ist es hierbei, die Resektionshöhle intraoperativ mit einem konfokalen Laserendoskop abzutasten/fahren und möglichen verbliebenen Tumorrest zu erkennen und ggf. zu reseziieren. Bisher gibt es keine beschriebene Anwendung der nicht fluoreszenzbasierten konfokalen Laserendomikroskopie am ZNS.

### I.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, erstmals die konfokale EndoMikroskopie ohne Fluoreszenzmarker (CLEM: Confocal Laserendomicroscopy) zur visuellen Darstellung von gesundem und pathologisch verändertem ZNS-Gewebe bis zur zellulären Ebene anzuwenden und die Möglichkeiten dieser neuen Methode zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Gehirntumore intraoperativ direkt nach Resektion, als auch frisches gesundes Maushirn mittels CLEM untersucht. Anschließend wurden die



erzeugten Bilder mit konventionellen histologischen Schnittpräparaten miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die CLEM Bilder einem Neuropathologen zur Beurteilung verblindet vorgelegt.

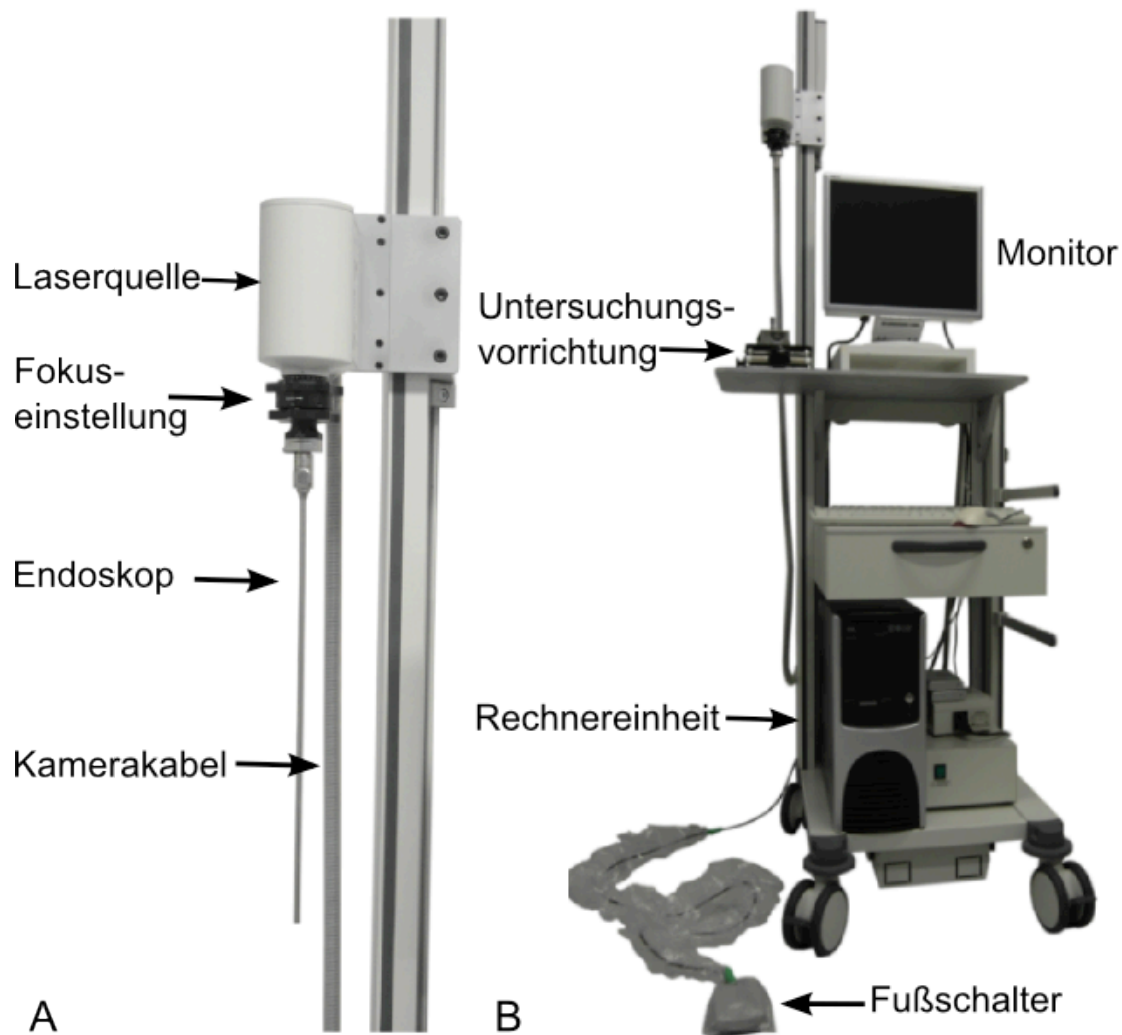
## **II Materialien und Methoden**

Die Kommission für Ethik in der ärztlichen Forschung des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg gab ihr positives Votum am 10.11.2010 für die vorliegende Studie.

### **II.1 Das konfokale EndoMikroskop**

Von der Firma Storz (Tuttlingen, Deutschland) wurde der Klinik für Neurochirurgie das konfokale EndoMikroskop EndoMAG1 für die Studie zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen Prototyp eines speziell angefertigten Endoskops, welches derzeit nicht kommerziell erhältlich ist. Das Endoskop wird mit der Software Heidelberg Eye Explorer (von Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) betrieben. Ursprünglich wird diese Software für den Heidelberg Retina Tomograph II genutzt und wurde speziell für die Klinik der Neurochirurgie mit dem EndoMAG1 verknüpft.

Bei dem verwendeten Endoskop handelt es sich um ein starres Laserendoskop (siehe Abbildung 1A) mit einer konstanten Wellenlänge von 633 nm, weswegen keine Fluoreszenz nötig ist. Der äußere Durchmesser des Endoskops beträgt 5 mm. Das Karl Storz System arbeitet mit Hopkins Stablinsen. Die Größe des aufgenommenen Bildes beträgt 300x300 µm (X-, Y- Achse). Laut Herstellerangaben können Objektdetails bis etwa 2 µm aufgelöst werden. Die Bildrate beträgt 40 Bilder/ Sekunde, sodass eine Echtzeit Aufnahme möglich ist. Die digitale Bildgröße beträgt 384x384 Pixel. Die Optik des Endoskops ist grundsätzlich sterilisierbar, sodass die Anwendung in situ möglich ist.



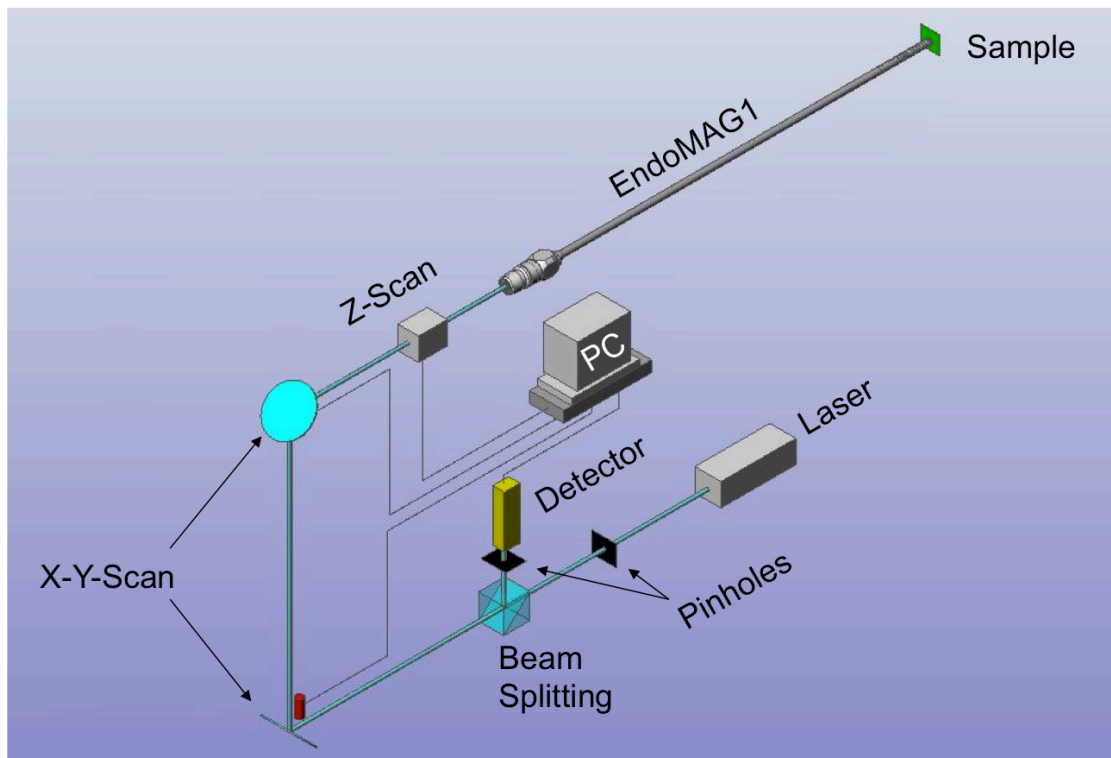
**Abbildung 1 Konfokales EndoMikroskop**

**A** Detailaufnahme: Starres EndoMikroskop, EndoMAG1, mit konstanter Wellenlänge von 633 nm, Hopkins Stablinsen, äußerer Durchmesser 5 mm; Größe des Abtastfeldes 300x300 µm, Bildauflösung bis maximal 2 µm. **B** EndoMikroskop mit Rechneinheit: Die Gewebeprobe wird unter das EndoMikroskop in die Untersuchungsvorrichtung platziert. Die erzeugten konfokalen Bilder erscheinen auf dem Monitor und werden mithilfe des Fußschalters ab fotografiert und anschließend gespeichert.

## II.2 Bilderzeugung

Das Konfokale EndoMikroskop ist ein digitales Laser-Raster-EndoMikroskop, mit dem auf zellulärer Ebene Livebilder erstellt werden.

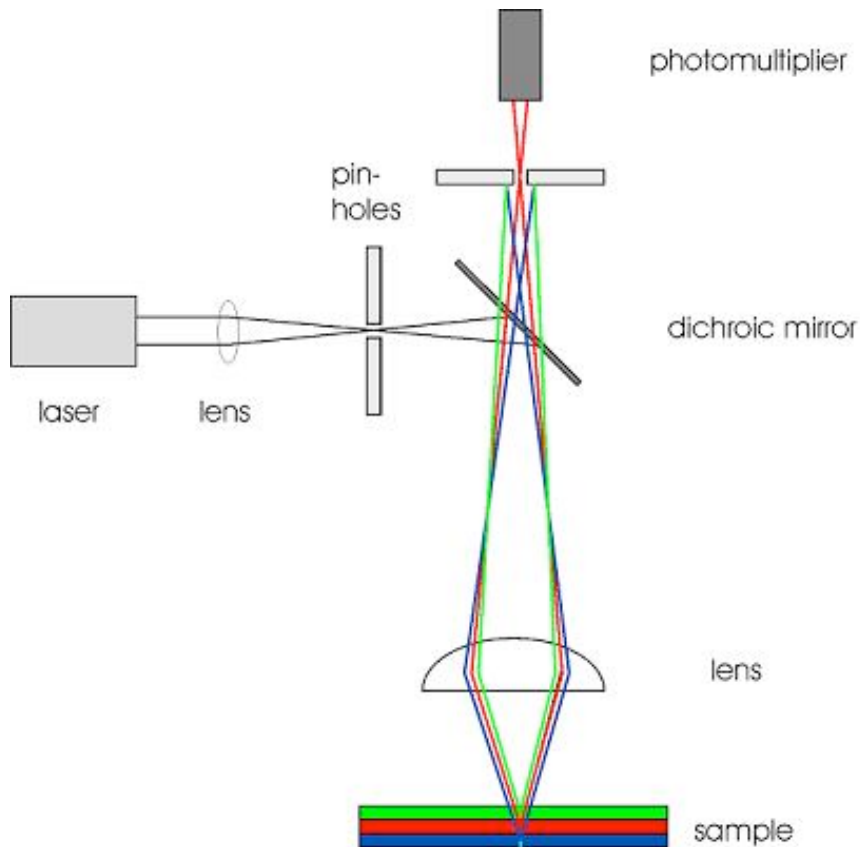
Das zu untersuchende Gebiet (300 x 300 µm) wird Punkt für Punkt von einem fokussierten Laserstrahl abgetastet und anschließend werden diese Informationen zu einem Bild zusammengesetzt. Die punktweise Rasterung des Präparats wird erreicht, indem der Laserstrahl durch sehr schnelle Bewegung der Scan-Spiegel waagrecht und senkrecht, also in X- und Y- Richtung, abgelenkt wird. Nur durch die hohe Geschwindigkeit ist die Erzeugung eines Echtzeit-Bildes möglich.



**Abbildung 2 Prinzip der Scannereinheit**

Die Scanspiegel lenken den Laserstrahl senkrecht und waagrecht (X und Y- Richtung) in hoher Geschwindigkeit ab. Dadurch wird die punktweise Rasterung des Präparats erreicht. Es entsteht ein elektrisches Signal, dass digitalisiert wird und in Form von Pixel auf den Bildschirm übertragen wird. Es entstehen zweidimensionale Objektinformationen.

Trifft der Laserstrahl auf Gewebe, kann es reflektieren, streuen und absorbieren. Reflexion tritt an Schichten mit unterschiedlichen Brechungsindizes auf. Je höher der Brechzahlunterschied zwischen angrenzenden Schichten ist, desto größer die Reflexion. Das reflektierte Licht aus der Fokusebene wird durch das konfokale EndoMikroskop zurück geleitet und trifft auf einen Detektor (Abbildung 2). Strahlen, die von außerhalb der Fokusebene kommen, werden von einer Lochblende gefiltert. Sie gelangen nicht zum Detektor. Die weitere Elektronik belegt jede Intensität mit einem bestimmten Grauwert. Es entsteht ein aus den einzelnen Abtastpunkten zusammengesetztes Grauwertbild.

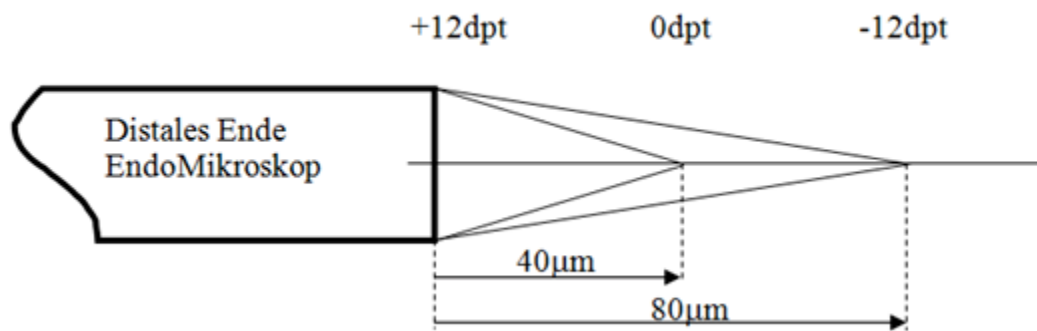


### Abbildung 3 Strahlengang in einem konfokalen EndoMikroskop

Der Laserstrahl wird durch eine Lochblende fokussiert und trifft auf einen Spiegel. Der Fokus befindet sich nun in der Fokusebene und wird reflektiert, gestreut, absorbiert oder transmittiert. Ausschließlich das reflektierte Licht aus der Fokusebene erreicht den Sensor (roter Strahlengang). Die übrigen Strahlen außerhalb der Fokusebene werden von einer weiteren Lochblende räumlich gefiltert (blauer und grüner Strahlengang).

An der Scannereinheit lässt sich der Fokuspunkt durch Drehen von -12 dpt bis +12 dpt und damit sein Abstand zum distalen Ende des Endoskops von 80 mm bis 0 mm verändern. Der Fokuspunkt, auch Brennpunkt genannt, ist der Punkt, von welchem eine scharfe Abbildung zu sehen ist. Die Wellenlänge bzw. die Lochblenden ändern sich dabei nicht.

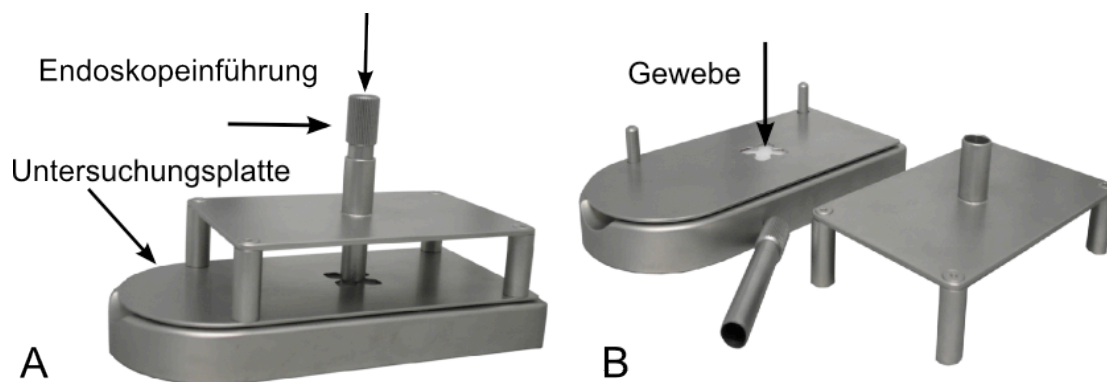
Um ein Bild zu erzeugen ist der unmittelbare Kontakt der Optik mit dem Gewebe erforderlich. Der ideale Fokuspunkt befindet sich bei +10 dpt bis +12 dpt.



**Abbildung 4 Fokus- Objekt Abstand**

Dargestellt ist das distale Ende des EndoMAG1. Mithilfe der Fokuseinstellung (s. Abbildung 1 A) lässt sich der Fokuspunkt, hier als zusammenlaufende Linien demonstriert, beliebig ändern. Bei der Einstellung von +12 dpt ist der Fokuspunkt direkt hinter der Linse; bei 0 dpt befindet er sich 40 µm, bei -12 dpt 80 µm hinter der Linse.

Für den ex vivo Einsatz in dieser Studie wurde speziell eine Vorrichtung (siehe Abbildung 5) konstruiert. Die Gewebeproben werden in der schmetterlingsförmigen Aussparung platziert und untersucht. Mit Hilfe einer Endoskopeinführung wird die Untersuchung stabilisiert, sodass Störartefakte wie z. B. Zittern oder Rauschen minimiert werden können. Damit ist es möglich, die Bildqualität und die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen zu verbessern, um eine Interpretation zu erleichtern.



**Abbildung 5 Untersuchungsvorrichtung A** Zusammengesteckt **B** Auseinandergesteckt

Die Gewebeprobe wird auf die Untersuchungsplatte in eine schmetterlingsförmige Aussparung gelegt. Die Halterung der Untersuchungsvorrichtung wird zusammengesteckt. Anschließend wird das starre Endoskop in die Endoskopeinführung eingeführt.

### II.3 Untersuchtes Maushirn

Im Rahmen einer anderen Studie, für die ein gesonderter genehmigter Tierversuchsantrag bestand, fiel frisches gesundes Maushirn an (verwendeter Mausstamm: C57Bl/6; Geschlecht: männlich; Alter: 16- 26 Wochen). Es wurden vier Mäuse getötet und kraniotomiert. Anschließend wurde jeweils das frische Hirn

entnommen und in verschiedenen Schnittebenen in 2 bis 3 mm starke Scheiben geschnitten. Diese Schnitte unterschiedlicher Hirnregionen wurden direkt im Anschluss mit dem CLEM untersucht.

Das Mausgewebe wurde anschließend in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den im CLEM untersuchten Regionen (Großhirnrinde, weiße Substanz, Balken und Kleinhirn) wurden HE-gefärbte Schnittpräparate angefertigt und diese miteinander nach bildmorphologischen Kriterien ausgewertet.

**Tabelle 1** Untersuchtes Maushirngewebe

Großhirn	Großhirnrinde Balken Marklager
Kleinhirn	Dreischichtiger Cortex: Molekularschicht Purkinje- Zellschicht Körnerschicht Marklager

#### II.4 Patientenkollektiv

In der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Marburg wurden Tumorproben von 35 Patienten mit intrakraniellen Tumoren im Zeitraum von Dezember 2010 bis November 2011 mit dem konfokalen EndoMikroskop untersucht. Die Patientengruppe umfasst 11 Männer und 24 Frauen zwischen 20 und 81 Jahren (Mittelwert 56,2 Jahre; SD: 14,37) mit intrakraniellm Tumor. Details zum Patientenkollektiv s. Tabelle 4. Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis erteilt.

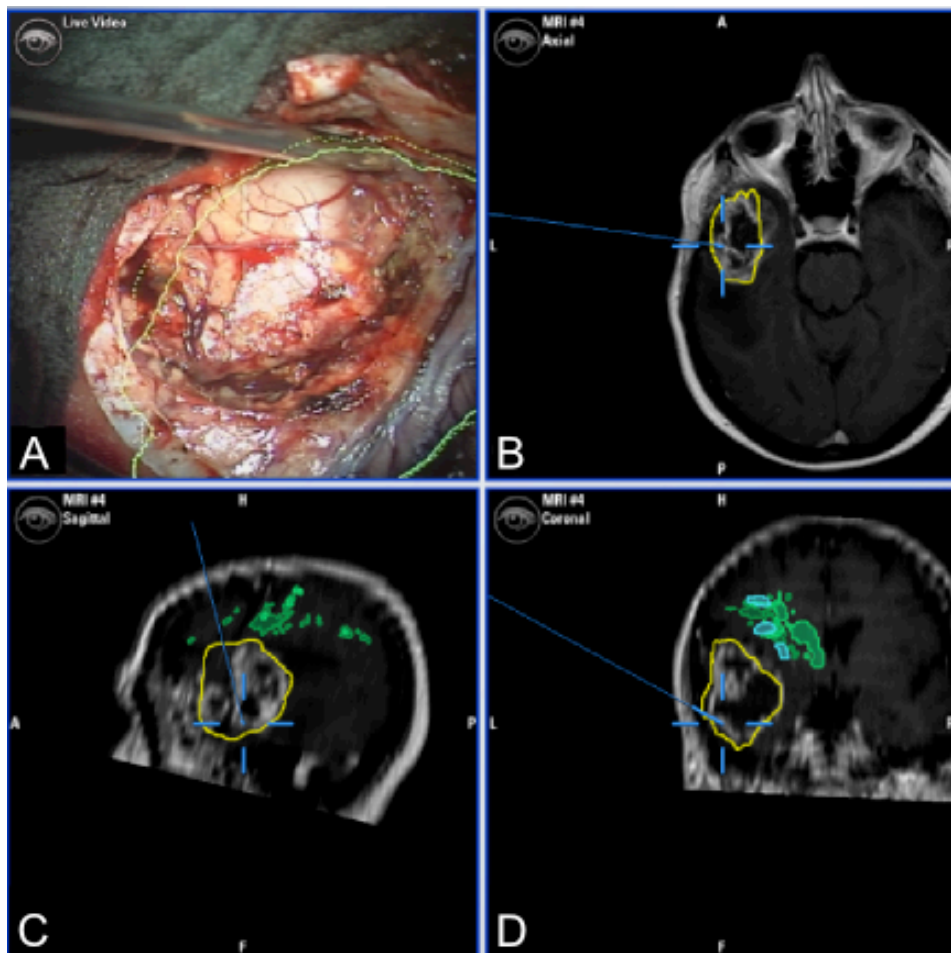
In die Studie eingeschlossen wurden männliche und weibliche Patienten, bei denen unabhängig von unserer Studie neuroradiologisch eine intrakranielle Raumforderung diagnostiziert wurde und die Indikation zur Tumorresektion bestand. Die Patienten mussten aufgrund ihrer geistigen und körperlichen Verfassung in der Lage sein, die Inhalte der Studie zu verstehen und in diese einzuwilligen. Ausgeschlossen wurden Patienten, die nicht einwilligungsfähig sind, sowie Patienten, deren Tumoren in der endgültigen histopathologischen Aufarbeitung nicht klar klassifiziert werden können, und Patienten mit chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen.

Die endgültige Diagnosestellung der Tumorentität erfolgte histologisch in der Abteilung für Neuropathologie (ärztlicher Direktor Prof. Dr. A. Pagenstecher).

## II.5 Untersuchungsablauf und Methode

Gewebeproben des Tumors wurden zusätzlich zur Schnellschnittdiagnostik direkt nach der Resektion im Operationssaal mit dem konfokalen EndoMikroskop ex situ untersucht. Navigationsgestützt konnten gezielt Tumorproben aus inhomogenen Prozessen mit unterschiedlicher KM- Aufnahme aus den unterschiedlichen Arealen wie Randzone, Nekrose und vitale Tumorzellen entnommen und getrennt untersucht werden (Abbildung 6). Das Gewebe wurde in die Untersuchungsvorrichtung platziert (Abbildung 5) und untersucht. Anschließend wurde das Material unmittelbar histopathologisch aufgearbeitet.

Die auf dem Bildschirm erzeugten Livebilder wurden mit Hilfe des Fußschalters (Abbildung 1 B) ab fotografiert und gespeichert. Die Tumorproben wurden für 10 bis 20 Minuten systematisch mit dem Endoskop abgetastet, um einen umfangreichen Gesamteindruck des Tumors zu erhalten.



**Abbildung 6 Screenshot intraoperative MR- Navigation bei Glioblastomresektion**

A: Livevideo. Zu sehen ist das intraoperative Bild während der Resektion eines Glioblastoms. B: Axiales Schädel- MRT. Die detektierten Tumorgrenzen sind gelb umrandet. Das blaue Fadenkreuz projiziert die aktuelle Lokalisation des Operateurs auf das präoperative MRT. C: Sagittales Schädel- MRT. Hier sind zusätzlich eloquente Hirnregionen (Pyramidenbahn) grün markiert. D: Koronales Schädel MRT.

Die Proben wurden in der Neuropathologie im üblichen Vorgehen histopathologisch aufgearbeitet. Zu diesem Zweck wurden die Proben in gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um anschließend Schnittpräparate und Färbungen anzufertigen. Neben der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung, die für alle Proben angefertigt wurde, wurden abhängig von der Indikation weitere Färbungen wie die Elastica van Gieson (EvG) Färbung zur Darstellung von Bindegewebe und Fasern, eine Retikulinfaserversilberung nach Gordon-Sweets (GS) zur Darstellung von Retikulinfasern und immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Für die Auswertung der konfokalen Bilder wurden strukturelle und morphologische Bewertungskriterien wie Homogenität, Zytoarchitektur, Gewebestruktur, Zellgröße und Zelldichte definiert (Tabelle 2). Ergänzend dienten die histologischen Bewertungskriterien nach den Richtlinien der WHO nach Kleinhues und Cavenee von 2008 wie Kernpolymorphie, Mitosen, Nekrosen und pathologische Blutgefäße (Tabelle 3).

**Tabelle 2** Strukturelle und morphologische Bewertungskriterien

Strukturelle und morphologische Bewertungskriterien	Homogenität Zytoarchitektur Gewebestruktur Zellgröße Zelldichte
---	---

**Tabelle 3** Histologische Bewertungskriterien nach den Richtlinien der WHO

Kernpolymorphie	Variabilität der Tumorzellkerne (Größe, Form, Chromatingehalt)
Mitosen	Zeichen der Proliferation
Nekrosen	Strichförmige Nekrose, flächenhafte Zelluntergänge
Pathologische Blutgefäße	Glomeruloide Proliferate kleiner Blutgefäße oder abnorm kaliberstarke Gefäße

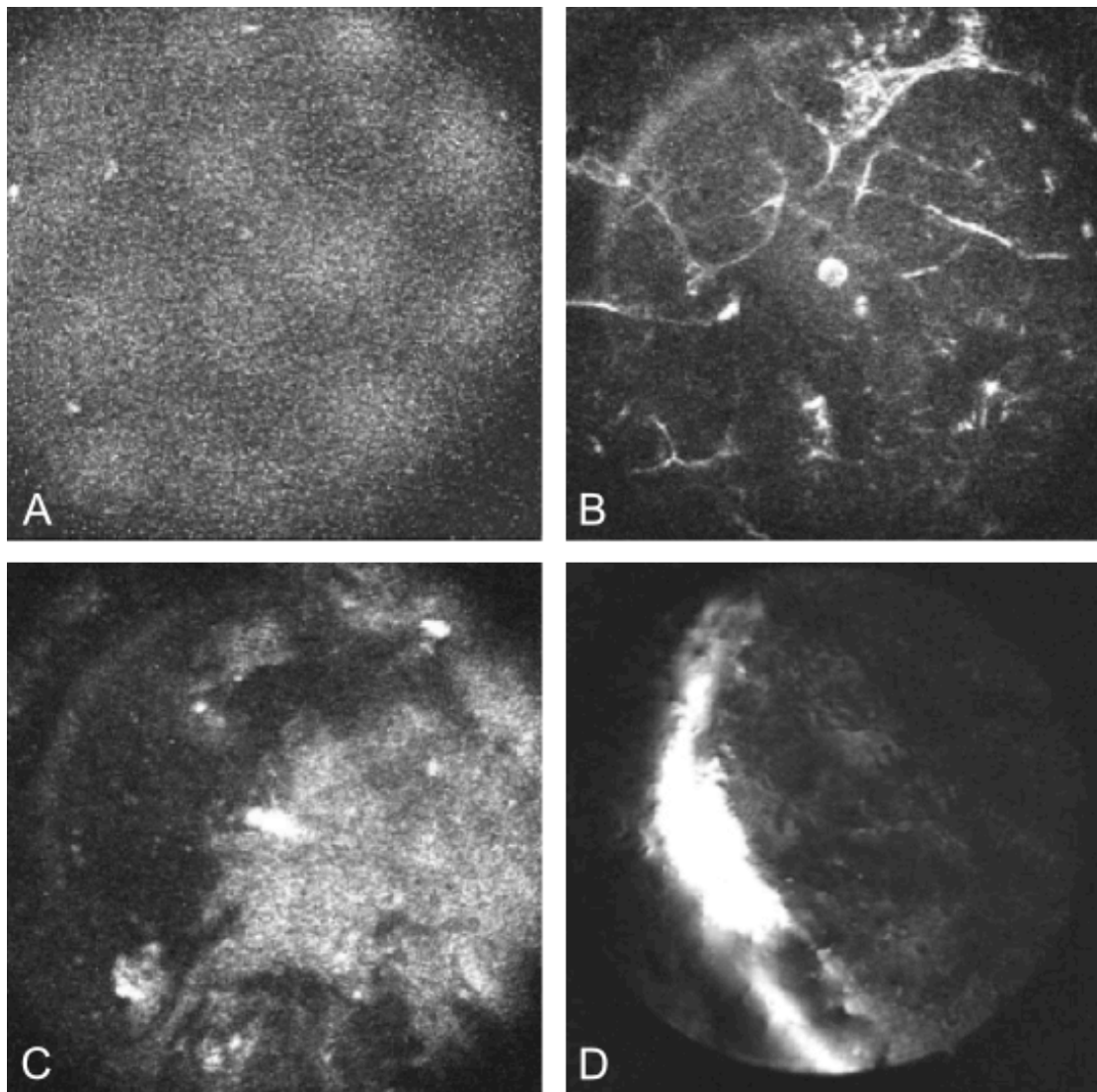
Um die Beurteilbarkeit und Treffgenauigkeit dieser neuen Methode zu überprüfen, wurden repräsentative Bilder aller Fälle (10 Bilder pro Fall) einem Pathologen verblindet zur Bewertung vorgelegt. Zu jedem Fall wurden folgende Kriterien beantwortet: Gesund/ Pathologisch; Glial/ Nicht-Glial.



### III Ergebnisse

#### III.1 Typische Artefakte

Zu den typischen Artefakten, die beobachtet werden konnten, gehörte Rauschen, Luftblasen, Bewegungsartefakte, diffuse Reflexion und Überlagerungen. Eine schlechtere Bildqualität konnte in weichem, zerfließlichem Gewebe beobachtet werden. Außerdem hing die Bildqualität stark von der Fokuseinstellung ab, die mit zunehmender Erfahrung optimiert werden konnte. Zu Beginn der Studie waren ca. 50% der Bilder pro Untersuchung verwertbar. Eine deutliche Verbesserung der Bildqualität konnte ab dem fünfzehnten Patienten verzeichnet werden, sodass ca. 90% der Bilder verwertbar waren.



**Abbildung 7 Auswahl typischer Artefakte**

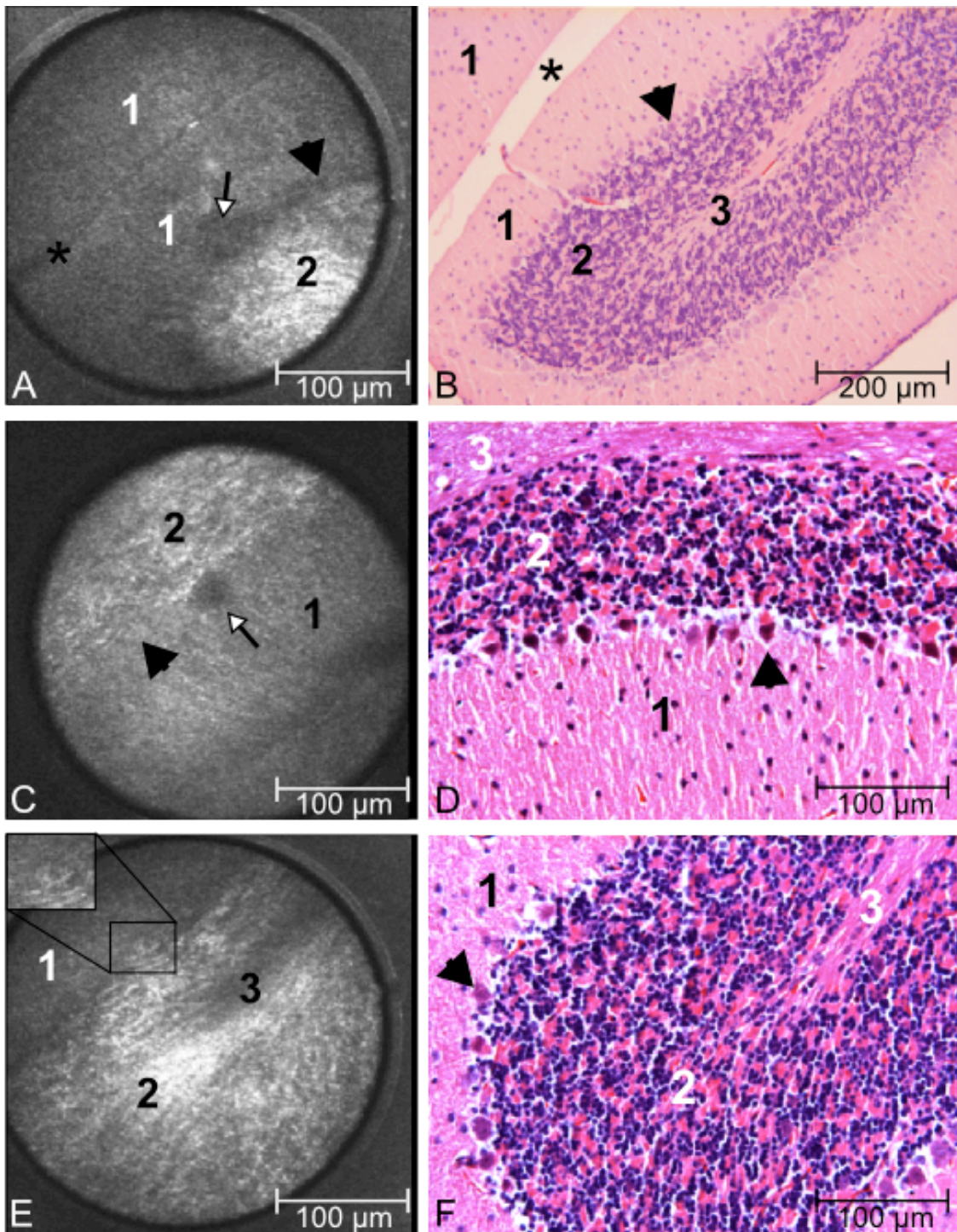
**A:** Rauschen. Es sind keinerlei Strukturen zu erkennen. **B:** Überlagerung des Gewebes mit Luftblasen. **C:** Bewegungsartefakt. Vereinzelt Strukturen sichtbar, aber kein klares Bild erkennbar. **D:** Hyperreflexion. Das umliegende Gewebe kann nicht scharf abgebildet werden.

## III.2 Das Referenzgewebe der Maus

Als gesundes Referenzgewebe wählten wir Maushirn, welches von Wildtyp Mäusen stammte, die im Rahmen einer anderen Studie euthanasiert wurden. Das Hirngewebe wurde ohne Verzögerung direkt nach der Tötung der Tiere und frischer Entnahme mittels CLEM untersucht. Von den vier untersuchten Mäusen wurden insgesamt 2318 Bilder vom Großhirn und 820 vom Kleinhirn aufgenommen.

### III.2.1 Kleinhirn

Die Kleinhirnanatomie mit ihrem klar gegliederten Aufbau des Stratum moleculare (Molekularschicht), Stratum ganglionare (Purkinjezellschicht) und des Stratum granulosum (Körnerzellschicht) kann entsprechend visualisiert werden (Abbildung 8). Die faserreiche Molekularschicht ist im CLEM als eine dunkelgraue Schicht, in der parallel liegende feine Fasern verlaufen, zu erkennen. Es handelt sich um die Dendriten der Purkinjezellen, Kletter- und Parallelfasern. Zum Teil lassen sich einzelne Zellen und Zellkerne identifizieren, die vereinbar mit Gliazellen sind (Abbildung 8 A). Die einschichtige Zelllage der Purkinjezellschicht trennt die Molekularschicht von der Körnerzellschicht und liegt dieser dicht an. In den konfokalen Bildern imponieren die Purkinjezellen als kleine schwer abzugrenzende Zellen von ca. 10 µm Größe. Gefäße im Querschnitt sind große dunkle Strukturen von ca. 40 µm Größe. Im CLEM stellt sich die Körnerzellschicht, die viele dicht gepackte Körner- und Golgizellen enthält, als eine hellgraue, fast weiße, granulär erscheinende Schicht dar. In ihrem Inneren schließt sie das Mark ein, welches eine ähnliche Grauwertstufe wie die Molekularschicht besitzt (Abbildung 8 E, F).



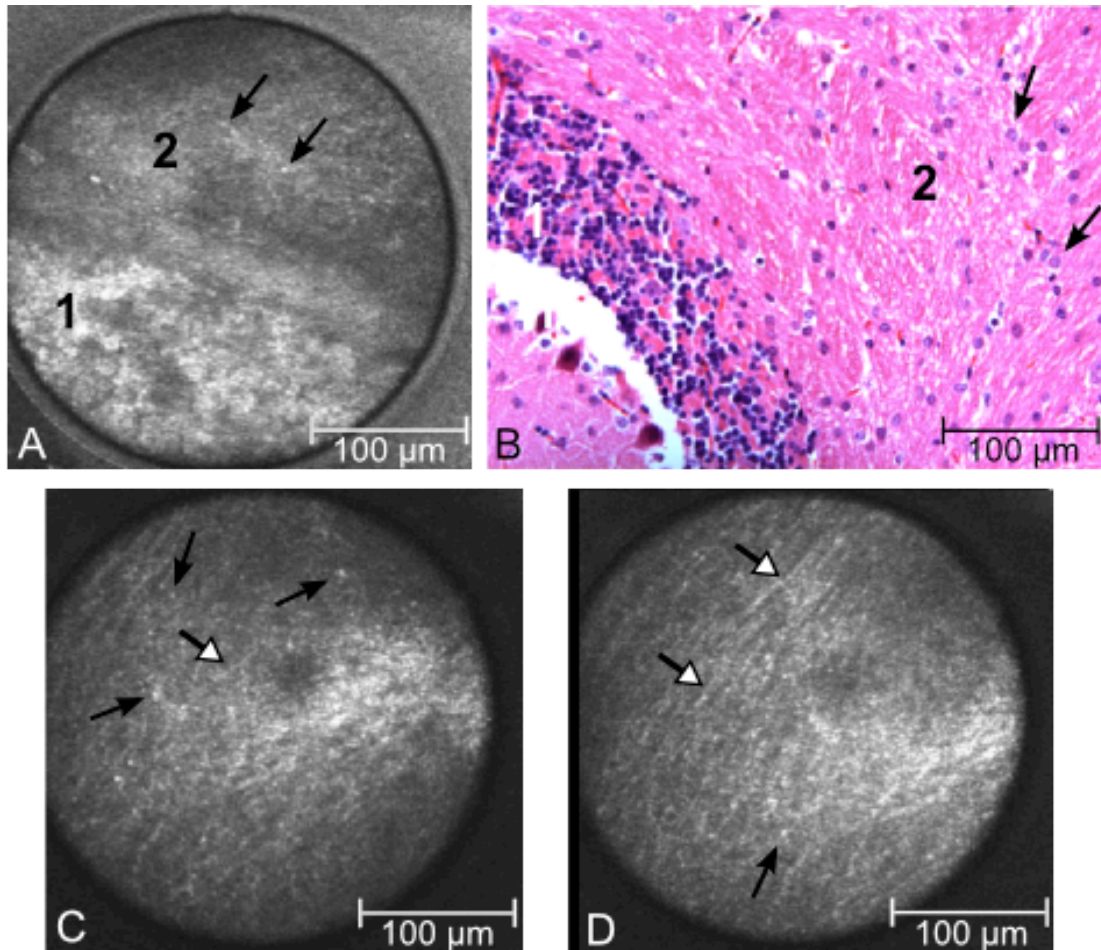
### Abbildung 8 Kleinhirn, Maus: Feinbau des Cortex cerebelli

Der typische neuronale Bau der Folia cerebelli der Hemisphären ist gleichförmig. **A- F:** Der dreischichtige Kortex gliedert sich in Stratum moleculare (Molekularschicht) (1), dem schmalen Stratum ganglionare (Purkinjzellschicht) (Pfeilspitze), Stratum granulosum (Körnerschicht) (2), Marklager(3). Fissura: Sternchen. Gefäße im Querschnitt: weißer Pfeil. **E.** Detailaufnahme einer Zelle, wahrscheinlich einer Purkinjzelle. **A, C, E** CLEM 300x300 µm. **B, D, F** Histologie, HE-Färbung, **B:** Vergr. 20- fach, **D, F:** Vergr.40- fach.

Mit dem CLEM gelingt es den Übergang von Körnerzellschicht zu Marklager darzustellen (Abbildung 9). Nervenfaserbündel lassen sich als hellgraue, zarte Fasern darstellen, die teils parallel und teils ungeordnet verlaufen. Zwischen diesen



Faserbahnen lassen sich Gliazellen erkennen (Abbildung 9 C, D). Eine eindeutige Differenzierung zwischen Blutgefäßen im Längsschnitt und Nervenfasern lässt sich im CLEM nicht sicher vornehmen.

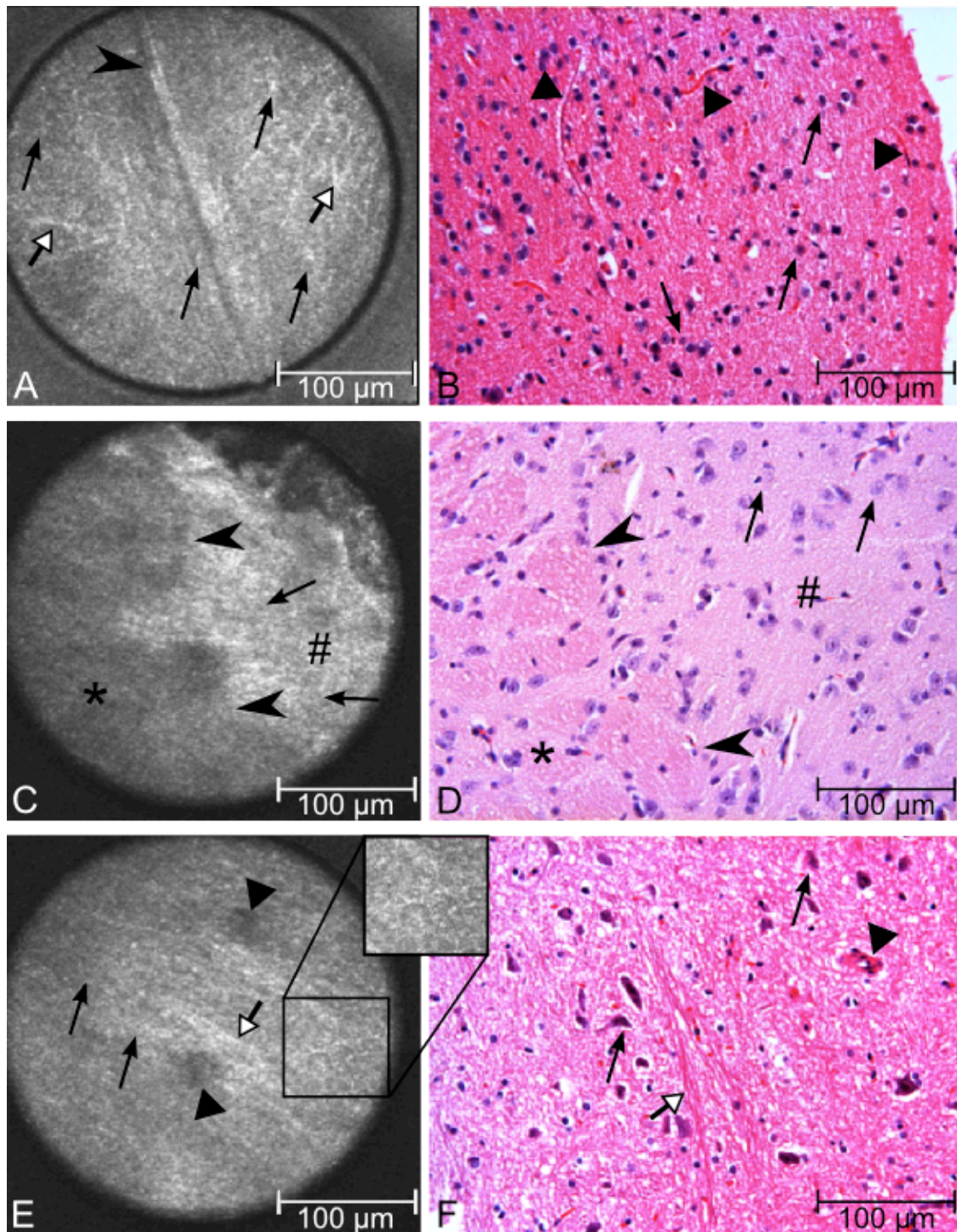


**Abbildung 9 Kleinhirn, Maus: Marklager**

Das gering ausgeprägte Marklager besteht vor allem aus Nervenfasern (weiße Substanz), in dem eingebettet die Kleinhirnerkerne liegen. **A, B:** An das Stratum granulosum (1) des Cortex cerebelli grenzt innenliegend das Marklager (2). **C, D:** Vernetzte Fasern (leerer Pfeil), die durchdrungen sind von Gliazellen (Pfeil). **A, C, D** CLEM 300x300 µm. **B** Histologie, HE-Färbung, Vergr. 40-fach.

### III.2.2 Großhirn

Im Großhirn war eine unruhige und chaotische Gewebearchitektur mit teils geordneten und teils ungeordnete Faserstrukturen im CLEM zu sehen (Abbildung 10 A, E). Zwischen diesen Nervenfasern liegen Zellen von unterschiedlicher Größe. Der Übergang von Cortex zu Marklager lässt sich visualisieren. Im CLEM stellt sich das Marklager als eine dunkelgraue homogene Schicht und die Rinde als eine hellere Schicht dar (Abbildung 10 C). In einigen Bereichen war die Rinde als körnige ruhigere Gewebestruktur mit wenigen parallel verlaufenden Fasern zu erkennen. Es finden sich teilweise unterschiedliche kleine rundliche Strukturen, die sich schwer zum umliegenden Gewebe abgrenzen und ca. 20 µm groß sind (Abbildung 10 E).

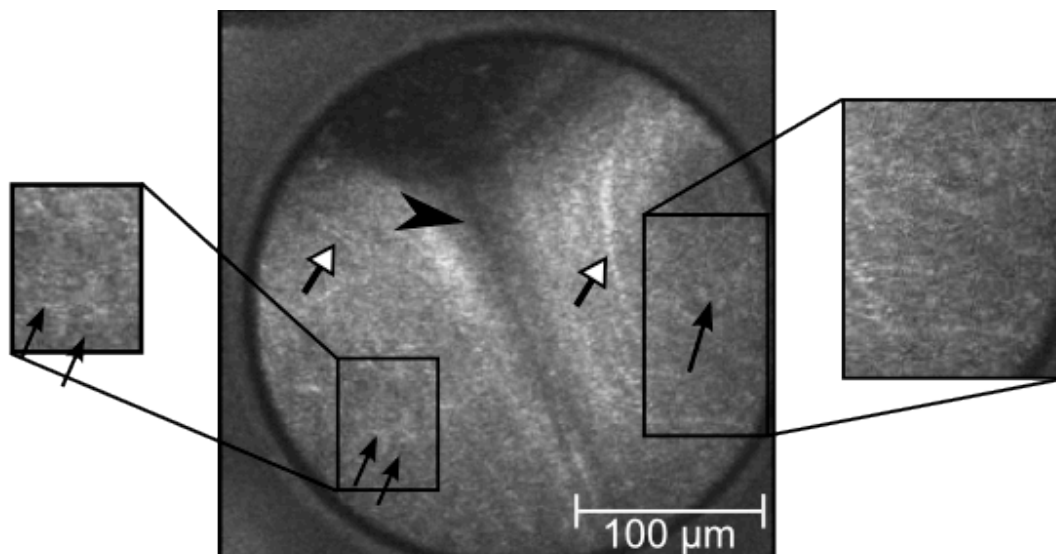


**Abbildung 10 Großhirn, Maus Cortex cerebri**

Nervenzellreiche graue Substanz. **A:** Es lassen sich Zellen (Pfeil) und feine Fasern (leerer Pfeil) abgrenzen. In der korrespondierenden Histologie **B** stellen sich Neurone (Pfeil) und zarte Gefäße dar. **C, D:** Übergang Cortex(#) zu Marklager (\*). Darüber befindet sich manipuliertes Gewebe. In der Histologie **D** erkennt man Faserbündel im Querschnitt. **E, F:** Es lassen sich Zellen (Pfeil) erkennen, die umgeben sind von Axonbündeln (leerer Pfeil). Dreieck: Artefakte, vereinbar mit Luftblasen. In der korrespondierenden Histologie in **F** stellt sich ein zellreicher Kortex mit gut differenzierbaren Pyramiden- und Gliazellen, sowie parallel verlaufenden Fasern dar. **A, C, E:** CLEM 300x300 µm. **B, D, F:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Pyramidenzellen besitzen eine eher dreieckige Form mit hellem Zytoplasma und dunklem Nukleus im CLEM (Abbildung 11). Es lassen sich unterschiedliche Zellen

erkennen, die sich in Größe und Form unterscheiden. Auch hier ist das Zytoplasma hell und der Nukleus dunkel.

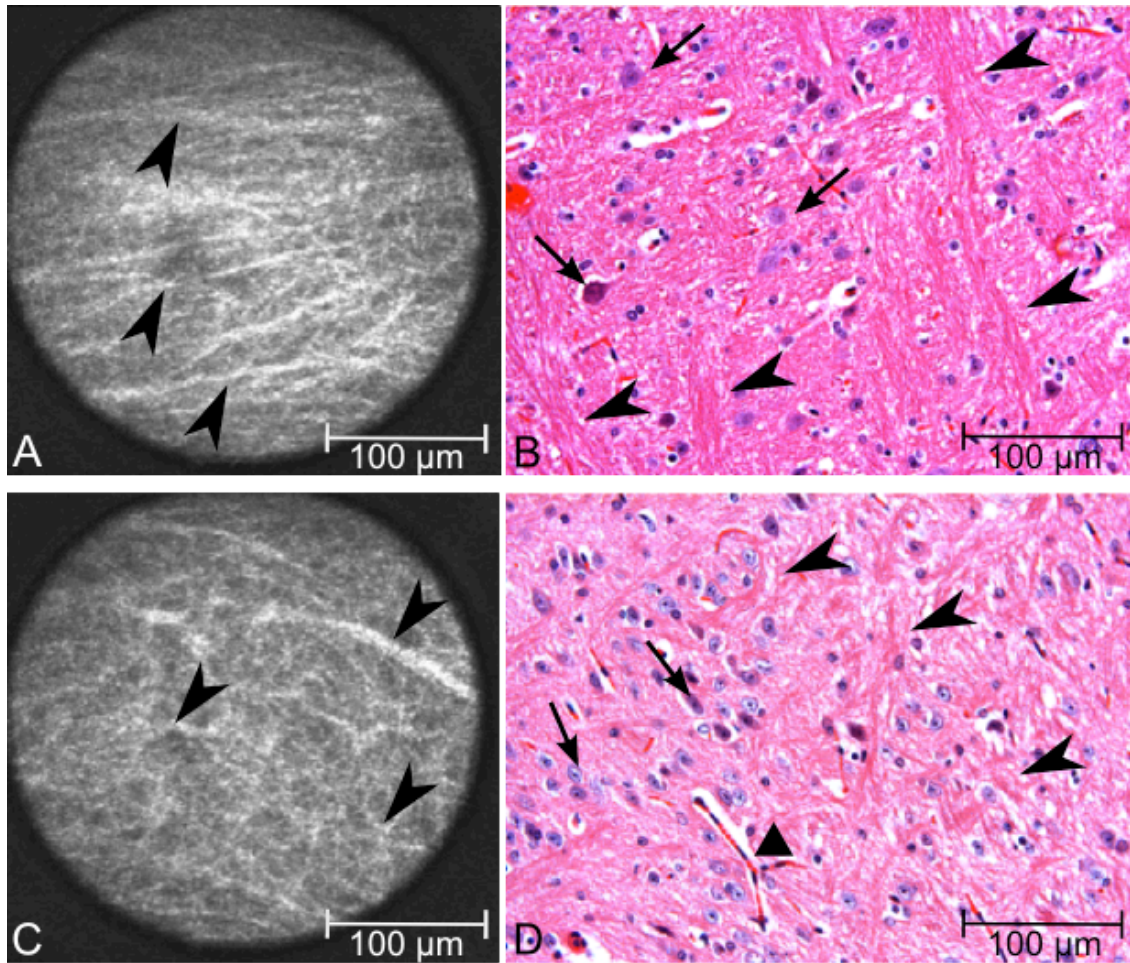


**Abbildung 11 Großhirn, Maus: Hemisphären in koronarer Schnittebene**

Linke und rechte Hemisphäre, getrennt durch die Fissura longitudinalis cerebri (Pfeilspitze). Es lassen sich Zellen (Pfeil) und feine Fasern (leerer Pfeil) abgrenzen. Detailaufnahme links: Pyramidenzelle mit darunterliegenden Gliazelle. Detailaufnahme rechts: unterschiedliche Zellen. CLEM 300x300 µm.

Im Marklager zeigen sich im CLEM zum einen zarte stark verzweigt verlaufende Fasern (Abbildung 12 A) und zum anderen feinere, netzartig miteinander verbundene Fasern (Abbildung 12 C).



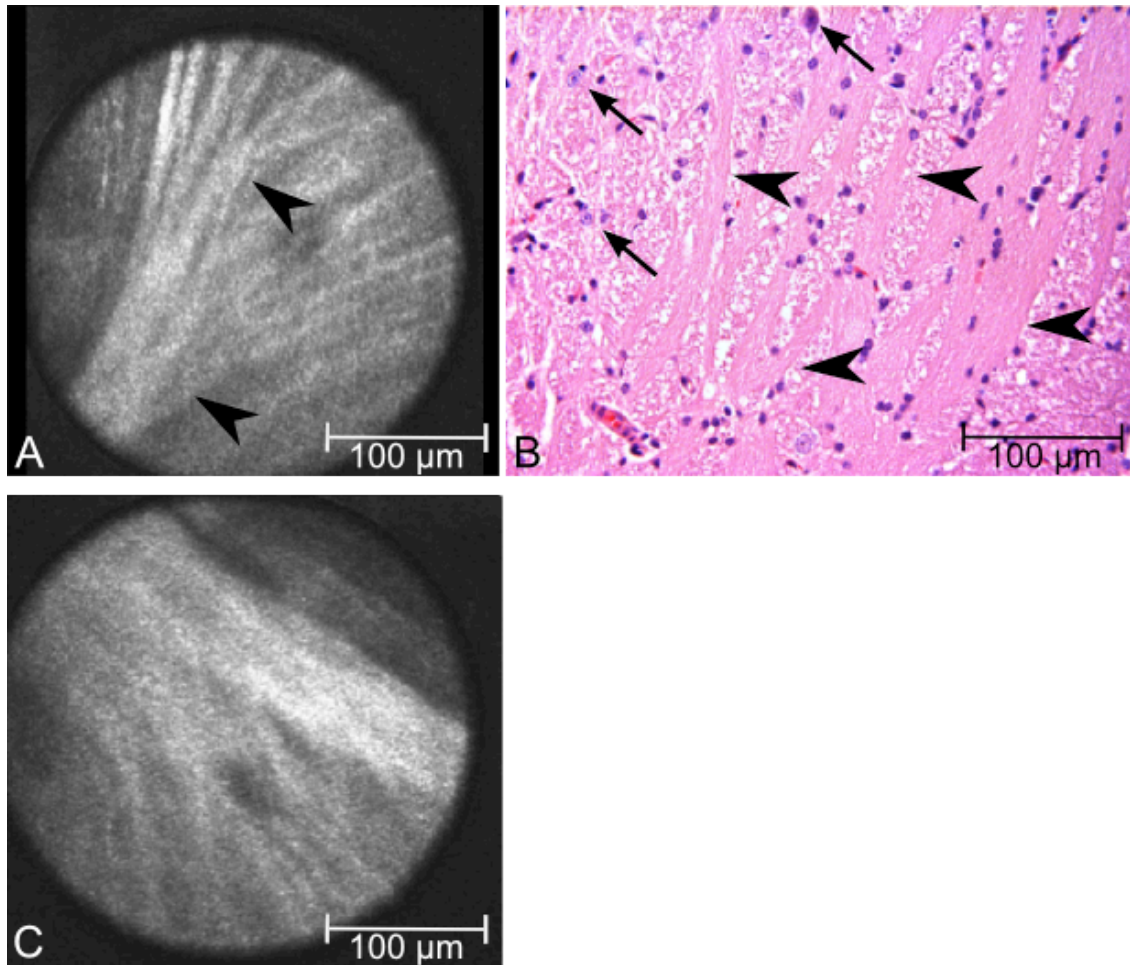


**Abbildung 12 Großhirn, Maus: Marklager**

**A, B:** Nervenfaserreiche (Pfeilspitze) weiße Substanz. Zarte, verzweigt verlaufende Fasern. **C, D:** Stark miteinander vernetzte feine Fasern. In der korrespondierenden Histologie stellt sich die Anatomie entsprechend dar. Es lassen sich zusätzlich Gliazellen (Pfeil) und Gefäße (Dreieck) abgrenzen. **A, C:** CLEM, 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Diese Fasern lassen sich im Verlauf mit dem CLEM verfolgen wie sie zu einer starken Faserplatte zusammenlaufen und den Balken bilden (Abbildung 13). Es sind hellgraue Fasern, die sich deutlich von der dunkelgrauen Schicht der übrigen Matrix hervorheben.





**Abbildung 13 Großhirn, Maus: Corpus callosum**

**A, B:** Zusammenlaufende Nervenfaserbündel, die sich zum Balken vereinigen. Inmitten der Faserbündel finden sich Gliazellen. **C:** Der Balken (Corpus callosum) ist die größte Kommissurenfaser im Hirn. Er stellt die Hauptverbindung der beiden Hemisphären her und besteht aus Millionen von Fasern, die hier zusammenlaufen. **A, C:** CLEM 300x300 μm; **B:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

### III.3 Das Tumorgewebe

Es wurden insgesamt 35 Patienten mit intrakraniellen Tumoren untersucht. Davon sind 7 Männer und 9 Frauen mit hirneigenem Tumor und 4 Männer und 15 Frauen mit nicht-hirneigenem Tumor. Es wurden 12 Meningeome WHO Grad I und II, 11 Glioblastome WHO Grad IV, 2 anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III, 3 Metastasen, 2 Kavernome und jeweils ein Oligoastrozytom WHO Grad II, pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II, anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III, Hämangioperizytom WHO Grad II und Hämangioblastom WHO Grad I - II untersucht (Tabelle 4). Mit dem CLEM wurden insgesamt 27.804 Bilder von allen untersuchten Tumoren erstellt, Mittelwert: 794,4 pro Fall; Variationsweite: 29 bis 2996 pro Fall. Die Anzahl war abhängig von der Größe des resezierten Gewebes und der Anzahl der Tumorproben.

**Tabelle 4** Patientenkollektiv

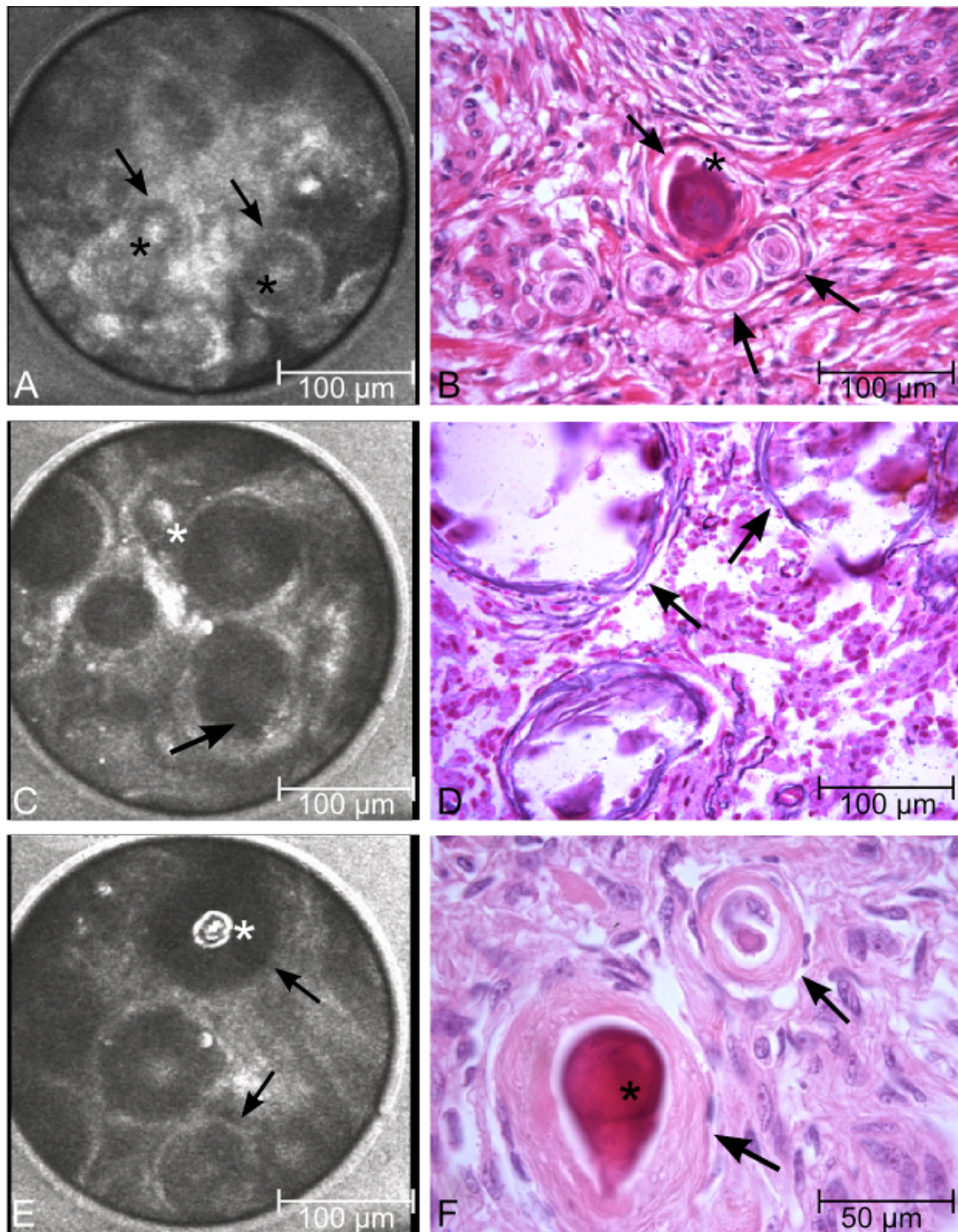
<b>Nr.</b>	<b>Tumorentität<sup>1)</sup></b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Bild- anzahl</b>	<b>Histologische Besonderheiten</b>
1	Glioblastom WHO Grad IV	m	72	736	Nekrose, Gefäßproliferate,
2	Hämangio-perizytom WHO Grad II	m	63	117	Geweiartige Gefäße, Bindegewebe, Einblutung
3	Meningeom WHO Grad I	w	69	211	Zellreicher Prozess, dichtes Retikulinfasernetzwerk, Psammomkörperchen
4	Meningeom WHO Grad I	w	73	455	Zellreicher, stellenweise mikrozystisch aufgelockerten Prozess
5	Oligodendrogliom WHO Grad III	w	20	362	Zellreicher Prozess, Gefäßproliferate, stellenweise Nekrose, Honigwabenstruktur
6	Metastase Mamma Ca	w	49	396	Epithelial differenzierter, adenoid aufgebauter Prozess
7	Glioblastom WHO Grad IV	w	53	250	Nekrosen, Gefäßproliferate
8	Glioblastom WHO Grad IV	w	58	226	Nekrose, Gefäßproliferate, Faserfilz
9	Oligoastrozytom WHO Grad III	w	44	114	Zellreicher, kleinzelliger Prozess, Gefäßproliferate, Verkalkungen
10	Meningeom WHO Grad I	m	72	343	Zellreicher Prozess, Wirbelformationen, Psammomkörperchen
11	Metastase Colon Ca	w	45	29	Nekrose, papillärer Aufbau, hochprismatische Epithelien, wenige Mitosen
12	Meningeom WHO Grad I	w	64	1061	Zellreicher, stellenweise feinzystisch aufgelockert, Wirbelformationen
13	Meningeom WHO Grad I	w	66	270	Psammomkörperchen, Wirbelformationen, zellreicher, bindegewebiger Prozess
14	Glioblastom WHO Grad IV	m	81	257	Flächige Nekrosen, eingeblutet, Gefäßproliferate
15	Oligoastrozytom WHO Grad II	w	49	328	Honigwabenstruktur, zarte Kapillaren
16	Glioblastom WHO Grad IV	m	64	192	Nekrose, dilatierte Gefäße, monströse Kerne, Gliafaserfilz
17	Meningeom WHO Grad I	w	62	135	Zellreicher Prozess, bindegewebige Septen, Wirbelformationen
18	Glioblastom WHO Grad IV	m	48	434	Flächige Nekrosen, Gefäßproliferate
19	Meningeom WHO Grad I	w	46	136	Zellreicher, feinzystisch aufgelockerter Prozess, fokale Bindegewebsbildung, Psammomkörperchen, Wirbelformationen
20	Kavernom	m	44	418	Mittel- und großkalibrige, dünnwandige Hohlräume, faseriges Bindegewebe
21	Meningeom WHO	w	28	569	Zellreicher Prozess,

	Grad I				Wirbelformationen, Bindegewebszunahme, Lochkerne
22	Glioblastom WHO Grad IV	m	49	1220	Nekrose
23	Hämangioblastom WHO Grad I-II	w	75	1196	Bindegewebiger Prozess, Kapillaren,
24	Meningeom WHO Grad I	w	61	1531	Zellreicher Prozess, Wirbelformationen, Psammomkörperchen, bindegewebige Septierung
25	Glioblastom WHO Grad IV	w	59	986	Nekrobiose, Gefäßproliferate, Gliafaserfilz,
26	Meningeom WHO Grad I	w	59	1481	Psammmkörperchen, zellreicher Prozess, Wirbelformationen
27	Meningeom WHO Grad II	w	45	1399	Zellreicher Prozess, Wirbelformationen, Psammomkörper, Mitosefiguren, dichtes Retikulinfasernetzwerk
28	Metastase Bronchial Ca	w	48	1123	Epithelial differenzierter, nekrotisierender Prozess, zahlreiche Mitosen
29	Oligoastrozytom WHO Grad III	w	57	545	Zellreicher Prozess, Gefäßproliferate, lymphozytäre Infiltrate, Retikulinfasernetzwerk
30	Meningeom WHO Grad I	m	72	1071	Zellreicher Prozess, Wirbelformationen, Psammomkörperchen, Bindegewebsreichtum
31	Kavernom	w	34	493	Großlumige und dünnwandige Blutgefäße, Kalkkonkremente, Einblutung
32	Glioblastom WHO Grad IV	m	51	2394	Nekrose, mehrkernige Tumorzellen, Bindegewebsproliferate, Gefäßproliferate
33	Glioblastom WHO Grad IV	m	81	2706	Nekrose, akut eingeblutet, mittel- großkalibrige Gefäße
34	Glioblastom WHO Grad IV	w	66	2996	Nekrose, Gefäßproliferate, frische Blutanteile
35	Pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II	w	41	1624	Zellreicher Prozess mit mittel- und großkalibrigen Gefäßen,

1) Die Diagnosestellung erfolgte in der Abt. Neuropathologie.

### III.3.1 Meningeom

Zwölf Patienten mit Meningeom wurden untersucht, davon elf Patienten mit Meningeom WHO Grad I, einen Patienten mit atypischen Meningeom WHO Grad II, 8662 CLEM Bilder, Mittelwert 721,83 pro Patient. Es ließen sich Psammomkörper (Abbildung 14), Zug- und Wirbelformationen, Zellen, Bindegewebe, Retikulinfasern (Abbildung 15) und die Dura mater (Abbildung 16) erkennen. Psammomkörper dominieren in der konfokalen Mikroskopie durch einen hellen Randsaum und einer zentralen Aufhellung (Abbildung 14 E). Weniger verkalkte Psammomkörper erscheinen hingegen grauer. Ihr Durchmesser schwankt in unseren aufgenommenen CLEM Bilder von 20 µm bis hin zu 150 µm innerhalb der verschiedenen Meningeome, aber auch innerhalb eines Meningeoms kann die Größe variieren. Psammomkörper können einzeln vorliegen oder in Gruppen (Abbildung 14).

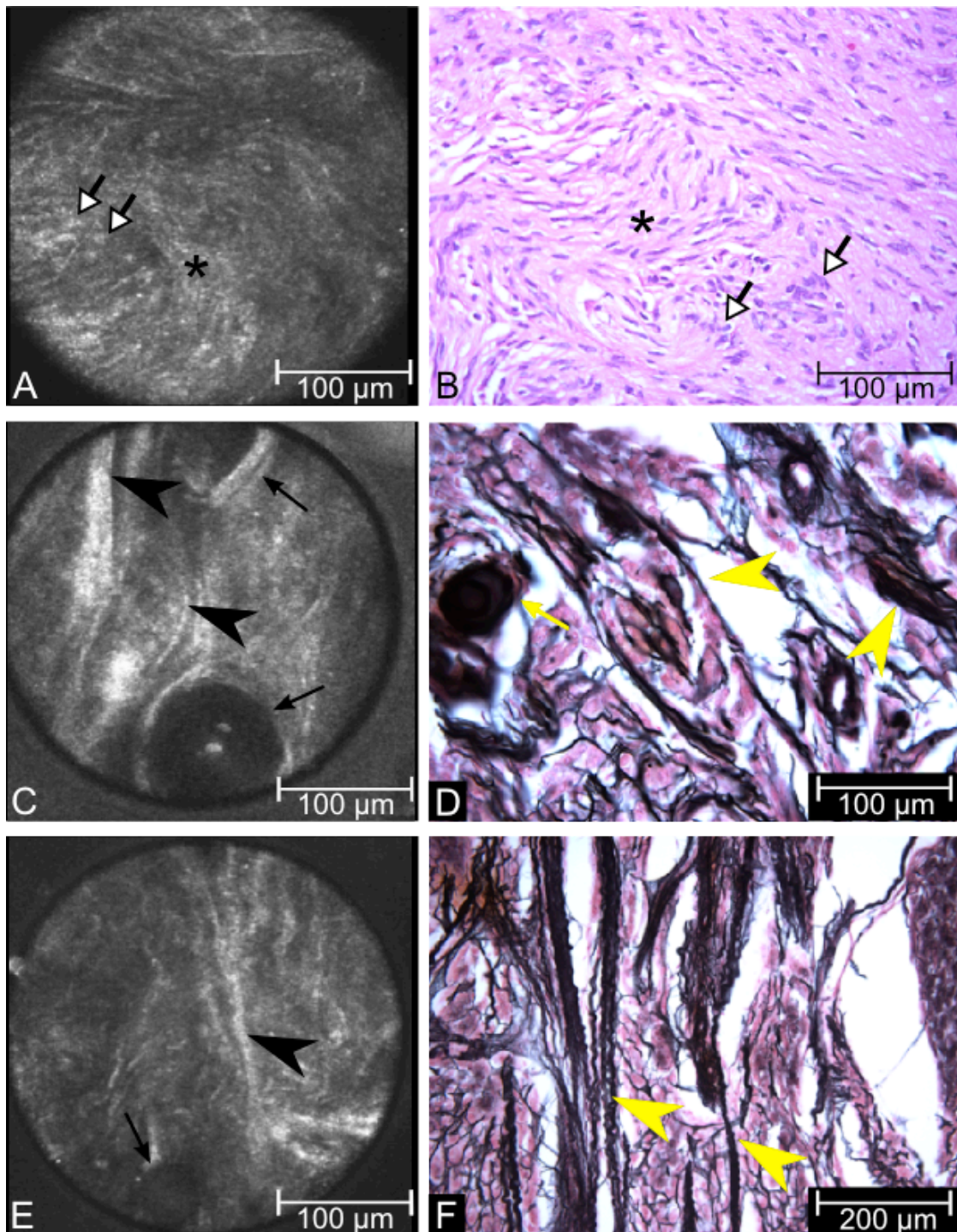


**Abbildung 14 Meningeom. Unterschiedliche Darstellung von Psammomkörper**

**A, B:** Patient 26: Transitionalzellmeningeom. Es sind zahlreiche Psammomkörper (Pfeil) von unterschiedlicher Größe und Dichtewerten zu erkennen, teilweise sind diese zentral verkalkt (Sternchen). In der Histologie sieht man die Tumorzellen in Lobuli und Wirbeln vorliegen. Ihre Zellkerne sind rund bis längsoval und von gering erhöhtem Chromatingehalt. Zwischen den Tumorzellen sind kleinere lymphozytäre Infiltrate zu erkennen. **C- F:** Patient 24: Psammomatöses Meningeom. Innerhalb des charakteristisch aufgebauten Tumors finden sich zahlreiche große Psammomkörperchen (Pfeil), die teilweise zentral stark verkalkt sind. **A, C, E:** CLEM 300x300 µm. **B, D, F** Histologie, **B:** HE- Färbung, Vergr. 40- fach; **D:** GS- Färbung, Vergr. 40- fach; **F:** HE- Färbung, Vergr. 100- fach.



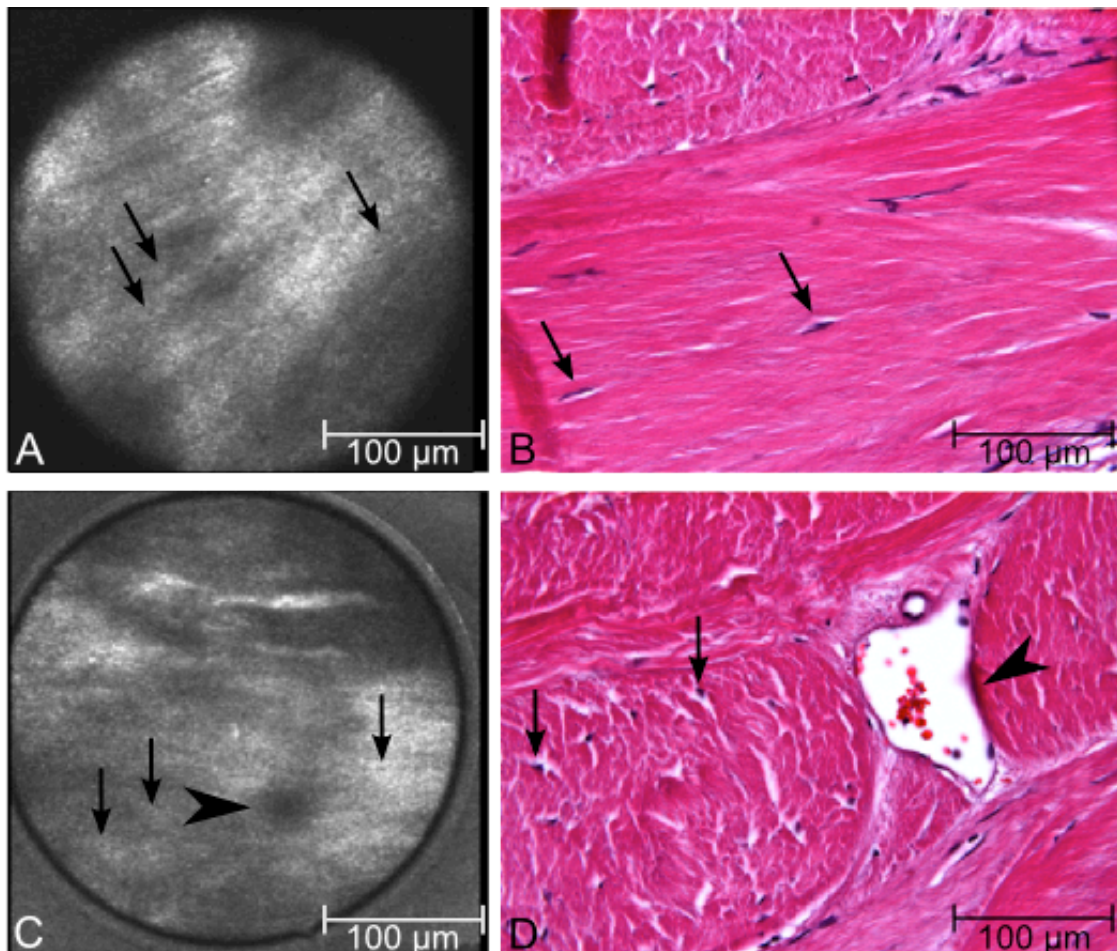
Inmitten der Zugformationen finden sich zahlreiche Tumorzellen mit fokal feinzystisch aufgelockertem Gewebe (Abbildung 15 A, B). Bindegewebe und Retikulinfasern erscheinen im CLEM im Gegensatz zum übrigen Gewebe heller. Es konnte ein dichtes bindegewebiges Stroma mit parallel verlaufenden Kollagenfaserbündeln gesehen werden (Abbildung 15 C bis F). In der Retikulinfaserversilberung nach Gordon Sweets in der Histologie färben sich die Retikulinfasern schwarz und werden bei dieser Färbung im Gegensatz zu den Zellen besonders hervorgehoben. Die Breite der Kollagenfaserbündel kann stark variieren. Innerhalb der Matrix finden sich stellenweise Psammomkörper.



**Abbildung 15 Meningeom: Wirbelformation und Retikulinfasernetzwerk.**

**A, B:** Patient 3: Fibröses Meningeom. Die Tumorzellen (leerer Pfeil) selber bilden charakteristische Zug- und Wirbelformationen (Sternchen) aus. Fokal ist das Gewebe feinzystisch aufgelockert. **C- F:** Patient 17: Transitionalzellmeningeom. Zu erkennen ist ein dichtes Retikulinfasernetzwerk und parallel verlaufende Kollagenfaserbündel (Pfeilspitze). Innerhalb der Matrix liegen Psammomkörper (Pfeil). **A, C, E:** CLEM 300x300 µm. **B, D, F:** Histologie. **B:** HE- Färbung, Vergr. 40- fach. **D:** GS- Färbung, Vergr. 40- fach. **F:** GS- Färbung, Vergr. 20- fach.

Mit der konfokalen Mikroskopie stellen sich die straffen, kollagenen Bindegewebsfasern der Dura mater als mittel- bis hellgraue, homogene, faserige Strukturen deutlich dar. Fibrozyten sind als kleine hellgraue Zellen mit dunklem Kern zu erkennen. Blutgefäße im Querschnitt sind als dunkle leere Struktur zu sehen (Abbildung 16).



**Abbildung 16 Meningeom, Dura mater.**

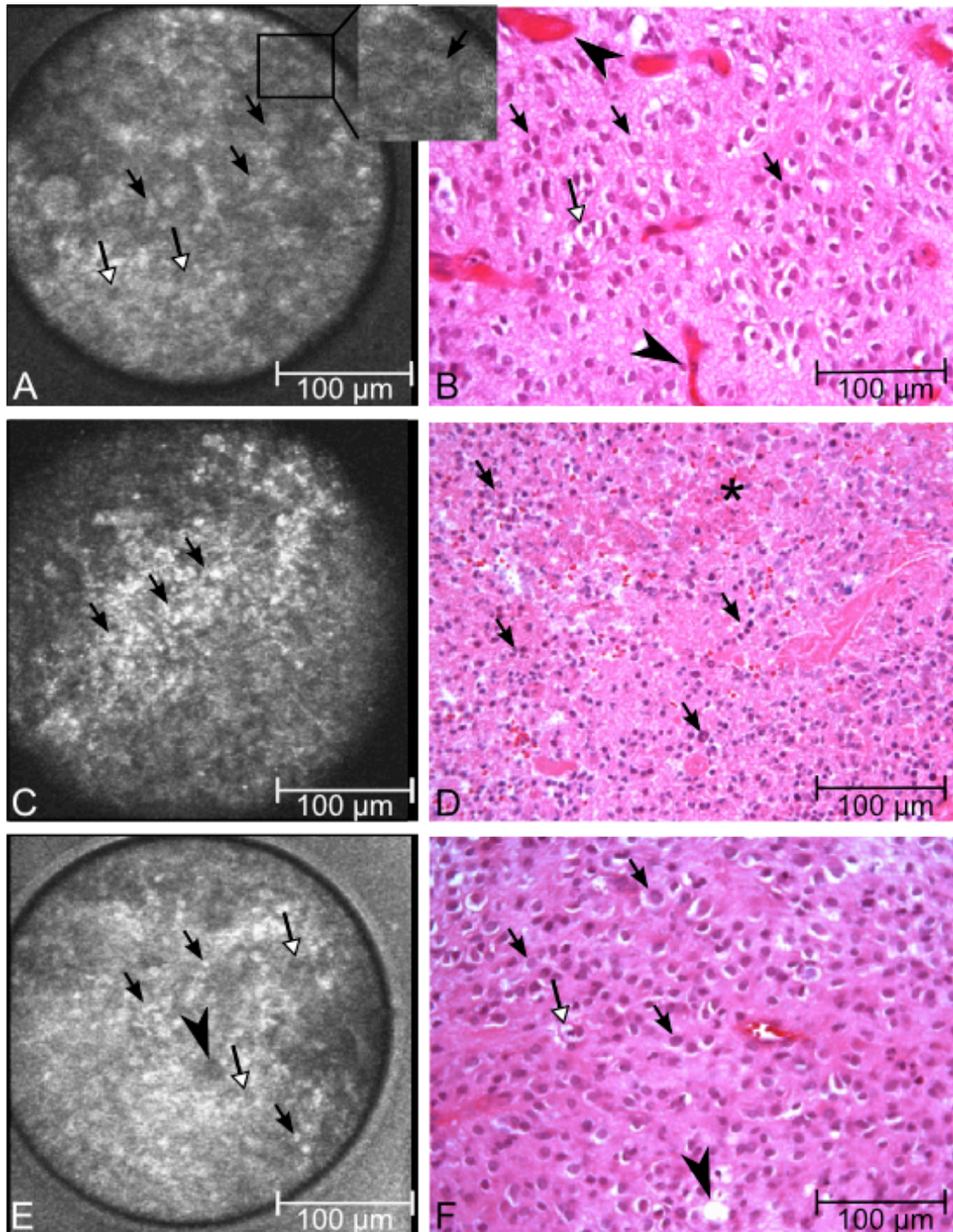
**A, B:** Patient 12. **C, D:** Patient 21. Straffes, faserreiches kollagenes Bindegewebe. Innerhalb der Extrazellulärmatrix befinden sich Fibrozyten (Pfeil) und Blutgefäße (Pfeilspitze). **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.



### III.3.2 Glioblastom

Es wurden elf Patienten mit Glioblastom WHO Grad IV untersucht, 12.397 CLEM Bilder, Mittelwert 1127 pro Patient. Im CLEM ist polymorphzelliges Gewebe mit buntem Zellbild und deutlicher Zellvermehrung in den Proben aus dem Tumorzentrum zu sehen. Die Zellen sind bis zu ca. 10 µm groß ohne eindeutige Zellgrenze (Abbildung 17 A). In der Detailaufnahme kann man mehrkernige Tumorzellen erkennen. Diese Zellen sind hell und in ihrem Inneren besitzen sie zwei dunkle runde Strukturen. Passend hierzu finden sich in der Histologie mehrere mehrkernige Tumorzellen (Abbildung 17 B). Außerdem fallen im CLEM dunklere Zellen bei denen kein Zellkern identifiziert werden kann auf. Daneben findet sich zellvermehrtes Tumorgewebe mit eher kleinen sehr hellen Zellen, die teilweise entrundet und polymorph sind. In einigen Zellen ist zusätzlich der Nucleus erkennbar, der sich zentral innerhalb der Zelle als dunkle Struktur darstellt (Abbildung 17 C). Sowohl in der konfokalen Mikroskopie als auch in der Histologie konnten vereinzelt Mikrozysten identifiziert werden, die sich im CLEM als kleine runde dunkle Aussparungen gezeigt haben (Abbildung 17 E, F).

Details innerhalb des Zellkerns oder die verschiedenen Mitosephasen innerhalb der Zelle lassen sich nicht zeigen. Ebenso kann die Kernpolymorphie der Tumorzellen im Gegensatz zur Zellpolymorphie nicht demonstriert werden. Es lassen sich teilweise mehrkernige Zellen erkennen (Abbildung 17 A), eine sichere Zuordnung ist allerdings problematisch. Außerdem lassen sich ein erhöhter Chromatingehalt oder intranukleäre Einschlüsse, wie sie in malignen Tumorzellen oft vorkommen, mit dem CLEM nicht darstellen. In allen untersuchten Tumorproben ließen sich Zellen erkennen, eine Zellpolymorphie haben wir in sechs von elf Patienten sehen können (54,5%). Die Bestimmung der Mitoserate gelang uns nicht (Tabelle 5).

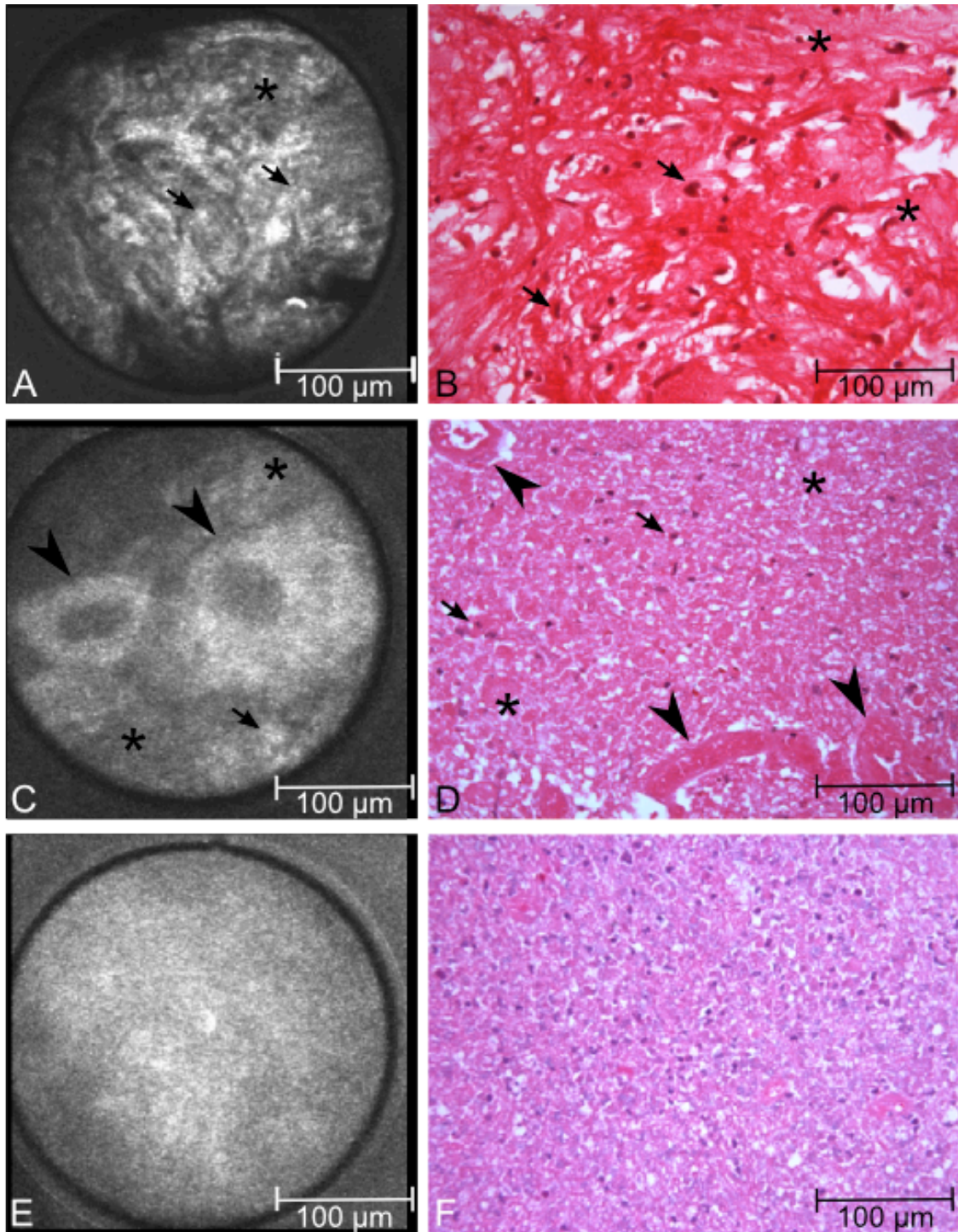


#### Abbildung 17 Glioblastom: Tumorzellen

**A, B:** Patient 34: Tumor zentral. Fragmentiertes und zellvermehrtes (Pfeil) Hirngewebe mit aktivierten Gefäßproliferaten (Pfeilspitze) und Tumorzellen mit hellem Zytoplasmasaum (leerer Pfeil). In der Detailaufnahme ist eine Zelle mit zwei Kernen zu sehen. **C, D:** Patient 14: Nekrobiotisch verändertes, astrozytär differenziertes Tumorgewebe. Neben Tumorzellen (Pfeil) erkennt man eingeblutetes Gewebe (Sternchen). **E, F:** Patient 34: Tumor Randbereich. Zellreicher, polymorphzelliger, glial differenzierter Prozess, der neben astrozytär (Pfeil) differenzierten Arealen parallel oligodendroglial (leerer Pfeil) differenzierte Bezirke mit andeuteter Honigwaben-Struktur aufweist. In den astrozytär differenzierten Arealen ist neben einer mäßigen Kernpolymorphie und erhöhten Chromatingehalt ein gemistozytärer Aspekt zu erkennen. Vereinzelnd sind Mikrozysten (Pfeilspitze) zu sehen. **A, C, E:** CLEM 300x300 µm. **B, D, F:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Flächige und ischämische Tumornekrose im GBM erscheint im konfokalen Bild sehr diffus, inhomogen und kontrastarm (Abbildung 18). Unterschiedliche Nekroseausprägungen können demonstriert werden. Neben nekrobiotisch verändertem Gewebe mit kleinsten vitalen Anteilen und fokal aufgelockertem Gewebe (Abbildung 18 A, B), zeigen sich ausgeprägte Gefäßproliferate im Querschnitt, die inmitten von flächiger Nekrose liegen (Abbildung 18 C, D), sowie flächige Nekrose mit Zelluntergang (Abbildung 18 E, F). Hier sind keine vitalen Zellen oder definitive Strukturen abzugrenzen. Flächige Nekrose wurde in acht von elf Patienten (72,7%) erkannt. Die strichförmige Nekrose mit Palisadenstellung konnten wir in keiner Gewebeprobe darstellen (Tabelle 5).



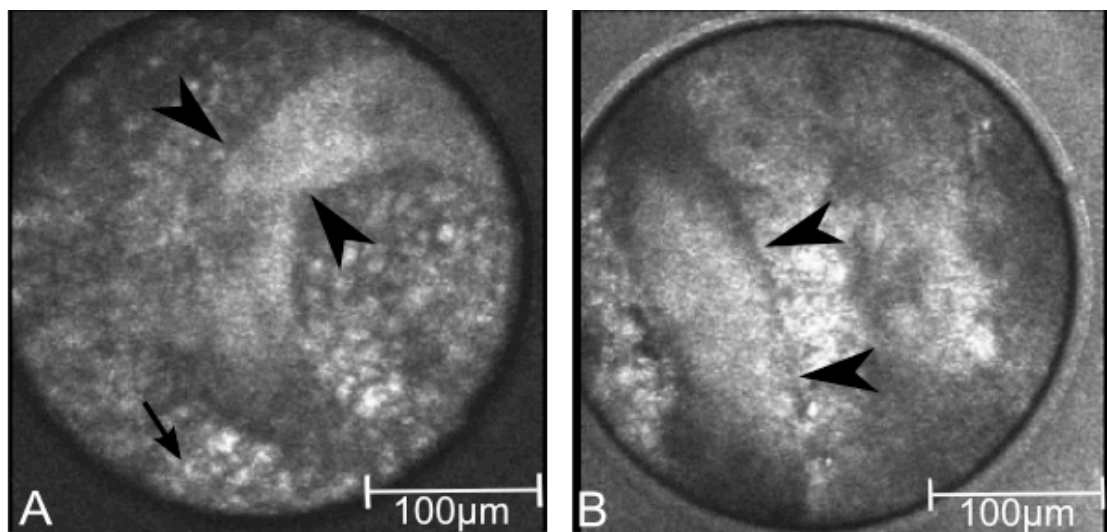


#### Abbildung 18 Glioblastom: Nekrose

**A, B** Patient 32: Zentrale Tumorregion. Nekrobiotisch (Sternchen) verändertes Gewebe mit kleinsten vitalen (Pfeil) Anteilen. **C, D**: Patient 34: Zentrale Tumorregion. Ausgeprägte Gefäßproliferate (Pfeilspitze) im Querschnitt, die inmitten von flächiger Nekrose (Sternchen) liegen. **E, F**: Patient 33: Zentrale Tumorregion. Flächige Nekrose mit Zelluntergang. Es sind keine definitiven Strukturen zu identifizieren. **A, C, E**: CLEM 300x300 µm. **B, D, F**: Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Kaliberstarke Gefäße können im Querschnitt (s. Abbildung 18 C, D) und im Längsschnitt visualisiert werden (s. Abbildung 19 A, B). Glomerulumartige Proliferate ließen sich nicht erkennen. Diese Schwierigkeit der Gefäßidentifikation spiegelt sich in

Tabelle 5 wider. Es gelang in drei von elf Gewebeproben (27,2%) die Identifikation von Gefäßproliferaten. Eingeblutetes Gewebe wurde in zwei von drei Proben erkannt.



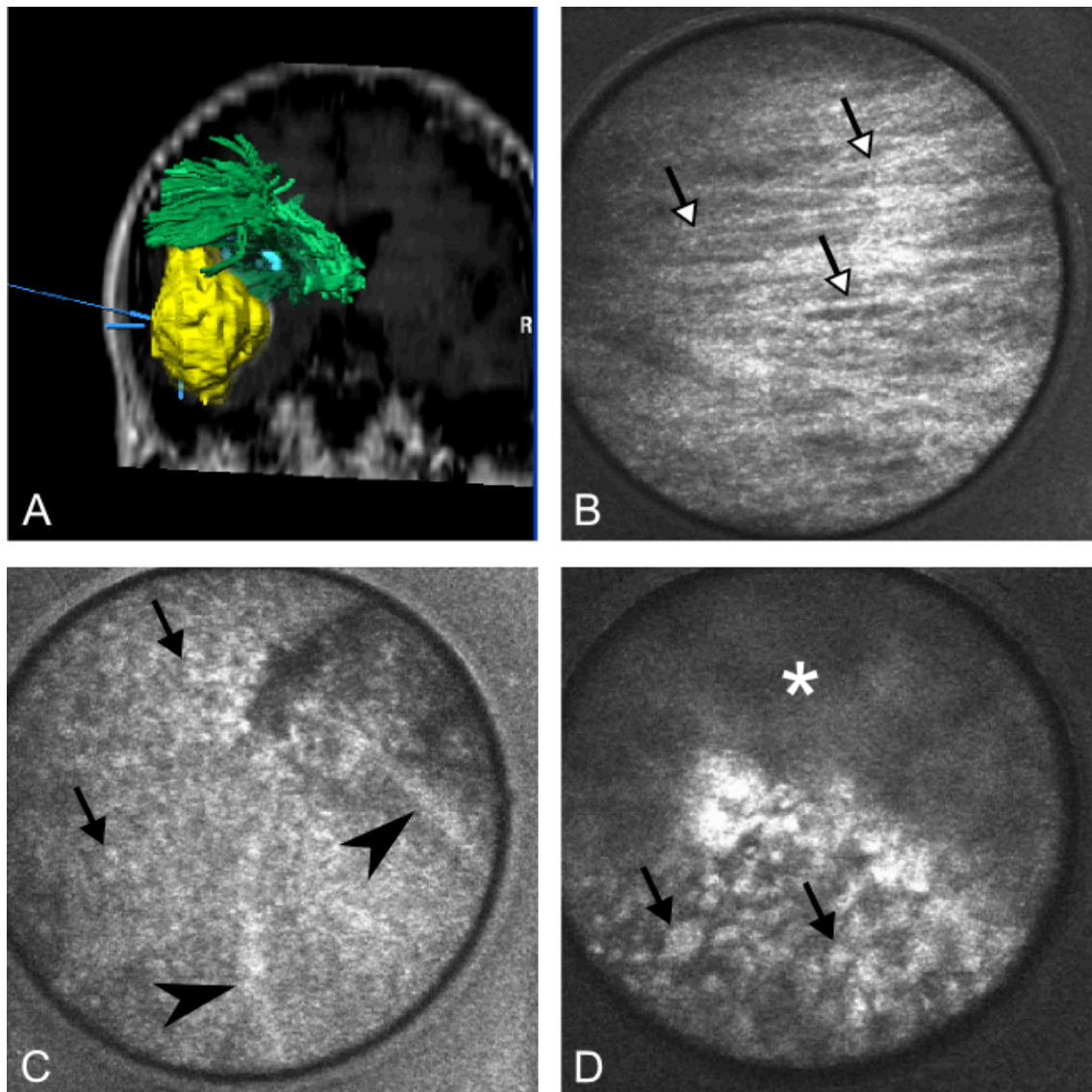
**Abbildung 19 Gefäßproliferate bei Glioblastom**

**A, B:** Patient 34: Kaliberstarke Gefäße (Pfeilspitze) bei Glioblastom inmitten von wahrscheinlich Tumorzellen (Pfeil). CLEM 300x300 µm.

**Tabelle 5 Glioblastom: Vergleich der Gewebestrukturen im CLEM und Histologie**

<b>Patient Nr.</b>	<b>Methode</b>	<b>Zellen</b>	<b>Zellpoly-morphie</b>	<b>Kernpoly-morphie/ Mitosen</b>	<b>Nekrose</b>	<b>Gefäß-proliferate</b>	<b>Blut</b>
1	CLEM	ja	ja	nein	nein	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	wenige	nein
7	CLEM	ja	nein	nein	ja	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
8	CLEM	ja	nein	nein	ja	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
14	CLEM	ja	ja	nein	ja	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	ja
16	CLEM	ja	ja	nein	nein	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	teilweise	nein
18	CLEM	ja	nein	nein	ja	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
22	CLEM	ja	ja	nein	ja	ja	ja
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
25	CLEM	ja	nein	nein	nein	nein	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
32	CLEM	ja	ja	nein	ja	ja	nein
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	nein
33	CLEM	ja	nein	nein	ja	nein	ja
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	ja
34	CLEM	ja	ja	nein	ja	ja	ja
	Histo	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Mittels CLEM ist es möglich den Übergang von Tumorzentrum, Tumorrandbereich und Übergang zum Kortex zu visualisieren (Abbildung 20).



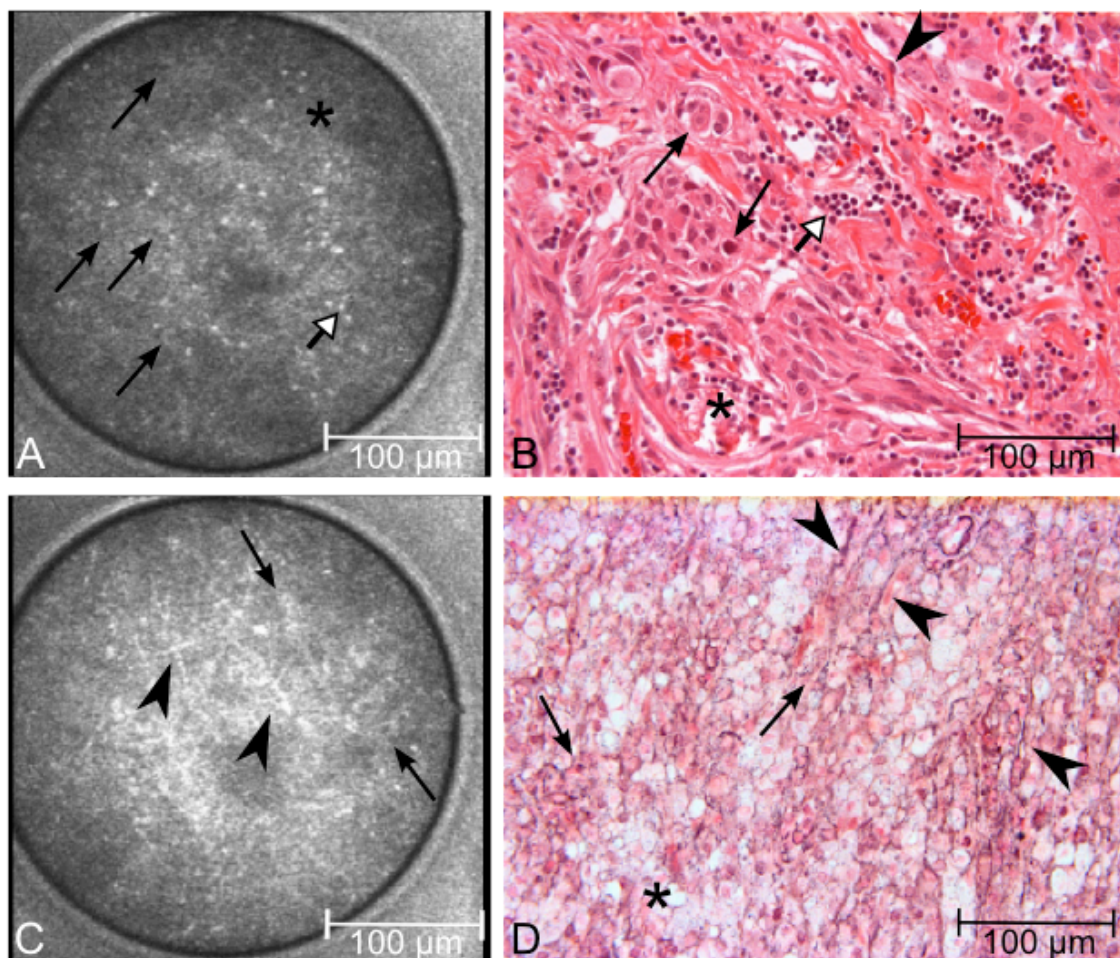
**Abbildung 20 Glioblastom, Patient 34: CLEM Bilder aus unterschiedlichen Tumorlokalisationen**

**A:** Screenshot Navi Coronal MRT: Gelb: Tumor, Grün: Bahnsysteme. **B:** CLEM: Tumor temporal mit Kortex: Fasern, vereinbar mit Bahnsystemen (weißer Pfeil). **C:** CLEM: Tumorrand: Zellvermehrtes Gewebe (Pfeile) mit Gefäßen (Pfeilspitze). **D:** CLEM: Tumor zentral: Zellvermehrtes Gewebe (Pfeile) mit angrenzender Nekrose (Sternchen). **B, C, D:** CLEM 300x300 µm.



### III.3.3 Andere Gliome

Bei der Untersuchung des pleomorphen Xanthoastrozytoms, ein untersuchter Patient, 1624 CLEM Bilder, zeigten sich charakteristische Merkmale dieses zellreichen und bunten Tumors. Tumorzellen stellen sich als graue runde Zellen mit zentral großem dunkelgrauen Nukleus dar (Abbildung 21 A). Daneben finden sich Erythrozyten oder lymphozytäre Infiltrate als sehr helle kleine Zellen ohne Zellkern. Das PXA zeichnet sich unter anderem durch sein dichtes interzelluläres Retikulinnetzwerk aus, das sowohl in dem konfokalen Bild als zarte ungeordnete Fasern (Abbildung 21 C) als auch in der Histologie (Abbildung 21 D) zu sehen ist.

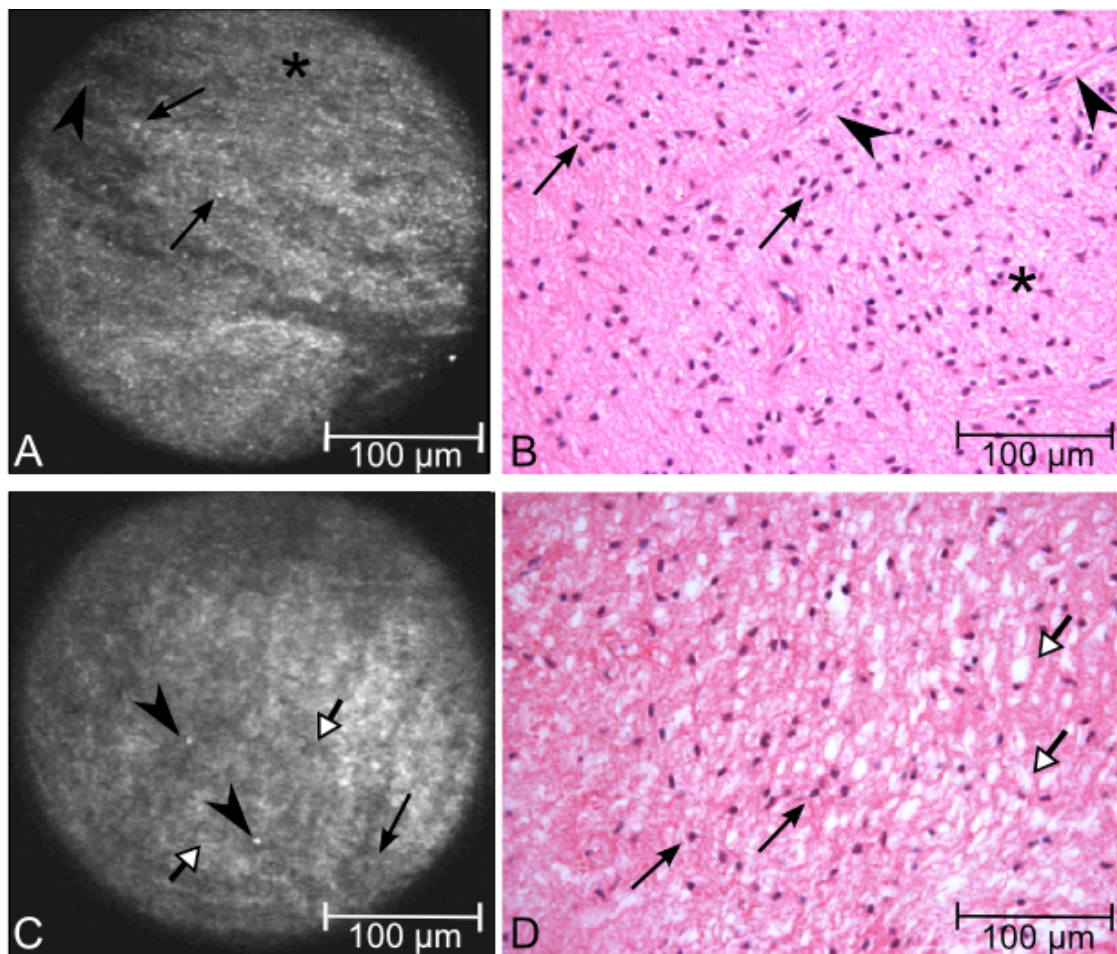


**Abbildung 21 Pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II, Patient 35**

**A, B:** Zellreicher (Pfeil), glial differenzierter Prozess mit Gefäßproliferaten (Pfeilspitze). Es zeigt sich ein buntes Zellbild zusammengesetzt aus fibrillären, riesigen, oft multinukleären neoplastischen Astrozyten, zarte Kapillaren, lymphozytären Infiltraten (leerer Pfeil) und stellenweise aufgelockertes Gewebe (Sternchen). Die Tumorzellen weisen mäßig eosinophile Zytoplasmata sowie teils ovale teils elipsoid konfigurierte Kerne mit moderat erhöhtem Chromatingehalt auf. **C, D:** Wir sehen ein dichtes interzelluläres Retikulinnetzwerk (Dreieck), sowie eine intrazelluläre Akkumulation von Lipiden in der Histologie **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, B: HE- Färbung, D: GS- Färbung, Vergr. 40- fach.



Zwei Patienten mit Oligoastrozytom wurden untersucht, ein Patient mit Oligoastrozytom WHO Grad II, 328 CLEM Bilder, zwei Patienten mit Oligoastrozytom WHO Grad III, 659 CLEM Bilder, Mittelwert 329,5 pro Patient. In der konfokalen Mikroskopie ist eine mäßig erhöhte Zelldichte von kleinen Zellen zu sehen mit fokal feinzystisch aufgelockertem Gewebe (Abbildung 22 A). Es finden sich zarte angedeutete Kapillaren, aber keine Gefäßproliferate. Nekrose zeigt sich nicht (Abbildung 22 A, C), was für einen niedrigmalignen Tumor spricht (WHO Grad I oder II). Passend dazu findet sich in der Histologie zu diesem Tumor ein niedrigmalignes Oligoastrozytom WHO Grad II (Abbildung 22 B, D). Teilweise ist ein wolkiges Bild mit mikrozystischer Degeneration und dazwischenliegenden Zellen zu sehen. Im CLEM fallen typische Mikrokalzifikationen als weiße Pünktchen auf. Eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen Zellkomponenten lässt das CLEM im Gegensatz zur Histologie nicht zu. Wir sehen zwar eine unterschiedliche Darstellung von Zellen, diese lassen sich jedoch nicht genauer zuordnen.

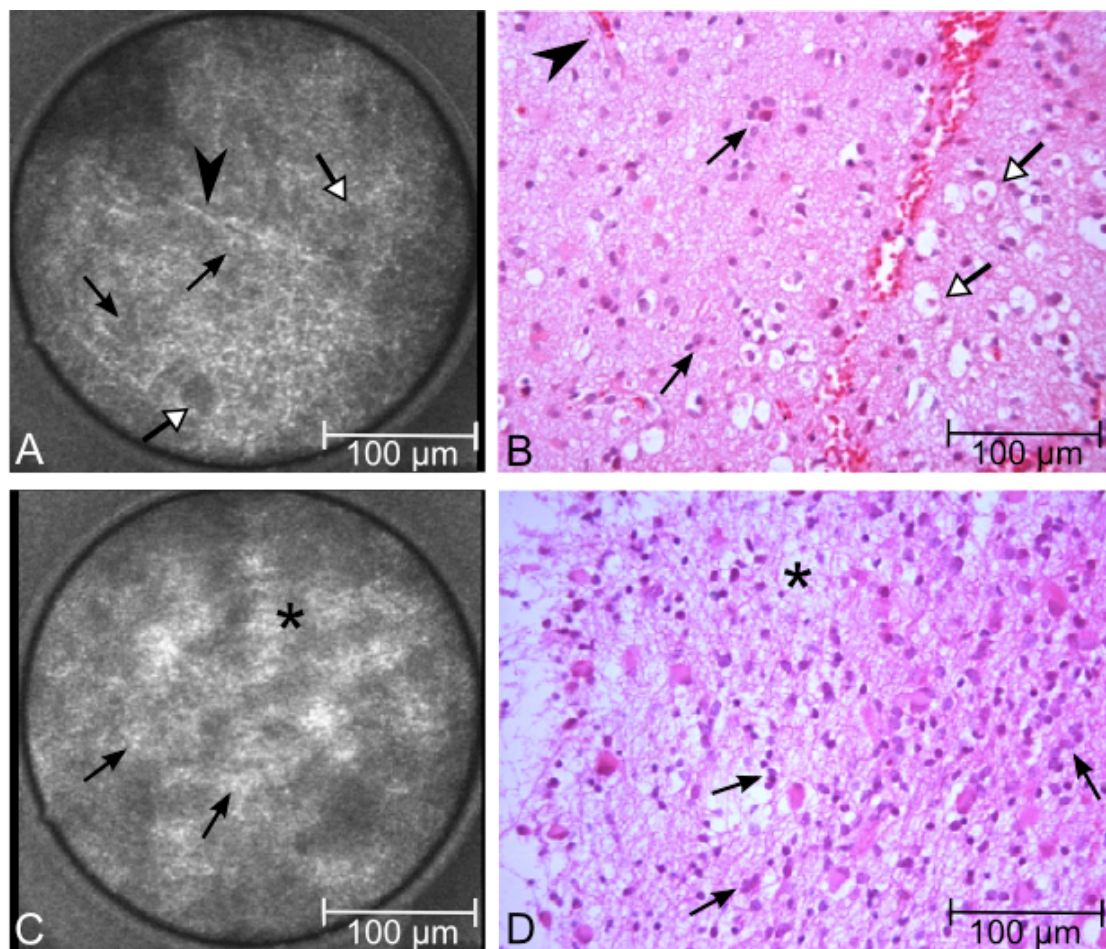


**Abbildung 22 Oligoastrozytom WHO Grad II, Patient 15**

**A, B:** Zellreicher Prozess (Pfeil) mit veränderten Astrozyten und Oligodendrozyten. Es zeigen sich zarte Kapillaren (Pfeilspitze), in der Histologie mit teils aktivierten Endothelien, aber keine Gefäßproliferate. Mitosefiguren und Nekrose sind nicht zu erkennen. **C, D:** Aufgelockerte Tumormatrix mit mikrozystischer Degeneration (leerer Pfeil), Tumorzellen (Pfeil) und Mikrokalzifikationen (Pfeilspitze). In der Histologie besitzen die Zellen überwiegend helle Zytoplasmata und zentrale Kerne, so dass ein Honigwabenaspekt entsteht. Stellenweise finden sich Tumoranteile, in denen die Zellen eosinophile Zytoplasmata besitzen. Die Zellkerne sind gering anisomorph. **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Im CLEM sieht man pleomorphe Tumorzellen, die teils entrundet und bizarr geformt sind (Abbildung 23 A). Sie besitzen ein helles Zytoplasma und einen dunklen Kern, der von Zelle zu Zelle unterschiedlich groß ist. Eine Differenzierung zwischen astrozytärer oder oligodendroglialer Komponente lässt das CLEM nicht zu. Um die Zellen herum befindet sich feinfilbrilläre Matrix, die einem Retikulinfasernetzwerk entsprechen kann oder zarten Kapillaren. Für die oligodendrogliale Komponente typische Mikrozysten erscheinen als runde, leere, dunkelgraue Strukturen (Abbildung 23 A). Beginnende Nekrobiose stellt sich als aufgelockerte Tumormatrix mit diffusen Strukturen und vereinzelt Zellen dar (Abbildung 23 C). Diese Kriterien der Zell- und Kernpolymorphie sowie Nekrobiose sprechen für Anaplasie und damit für einen Tumor mit erhöhter

Malignität. In der Histologie findet sich entsprechend ein Oligoastrozytom WHO Grad III.



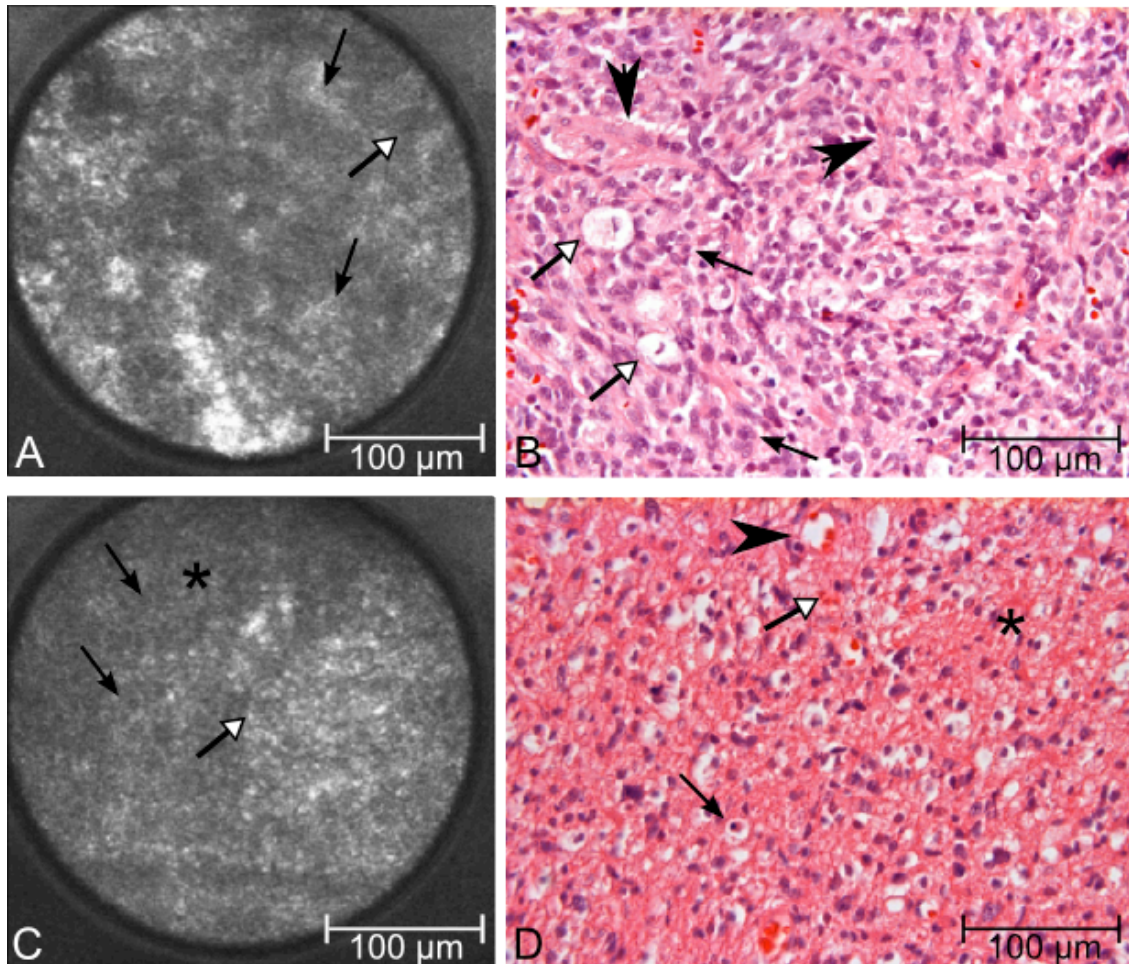
**Abbildung 23 Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III, Patient 29**

**A, B:** Zellreicher, polymorphzelliger und –kerniger Prozess mit angedeuteten Gefäßproliferaten (Pfeilspitze). Die Tumorzellen besitzen mäßig eosinophile Zytoplasmata, sowie hyperchromatische Kerne. Neben einer astrozytären Komponente (Pfeil) erkennt man eine oligodendrogliale Komponente (weißer Pfeil) und wenige Mitosefiguren. **C, D:** Aufgelockerte Tumormatrix (Sternchen) mit Tumorzellen (Pfeil) und teilweise untergegangenen Gewebe. **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Ein ähnliches Bild beobachten wir beim anaplastischen Oligodendrogliom WHO Grad III, ein untersuchter Patient, 362 CLEM Bilder. Innerhalb des zellreichen Prozesses unterscheiden sich die Zellen sowohl in Größe als auch Helligkeit und besitzen helle Zytoplasmata mit zentralen, polymorphen dunklen Kernen. Ein Honigwabemuster ist nur angedeutet zu sehen mit größeren, leer erscheinenden Höfen (Abbildung 24). In der korrespondierenden Histologie finden wir Tumorzellen mit einem klaren Zytoplasma und einer gut definierten Plasmamembran. Außerdem sehen wir eine streifige Faservermehrung, die vereinbar ist mit einem dichten Netz aus verzweigten Kapillaren (Abbildung 24 B). Diese Kapillaren zeigen sich in den konfokalen Bildern nicht. Teilweise sind Erythrozyten zu erkennen, die im CLEM als kleine weiße



Pünktchen dominieren (Abbildung 24 C). Eine eindeutige Klassifizierung der Zellen in den konfokalen Bildern gelingt nicht, sodass die Differenzierung zu den anderen Gliomen problematisch ist. Eine Differenzierung zwischen Anaplasie und niedrig maligne ist mittels CLEM allerdings möglich.

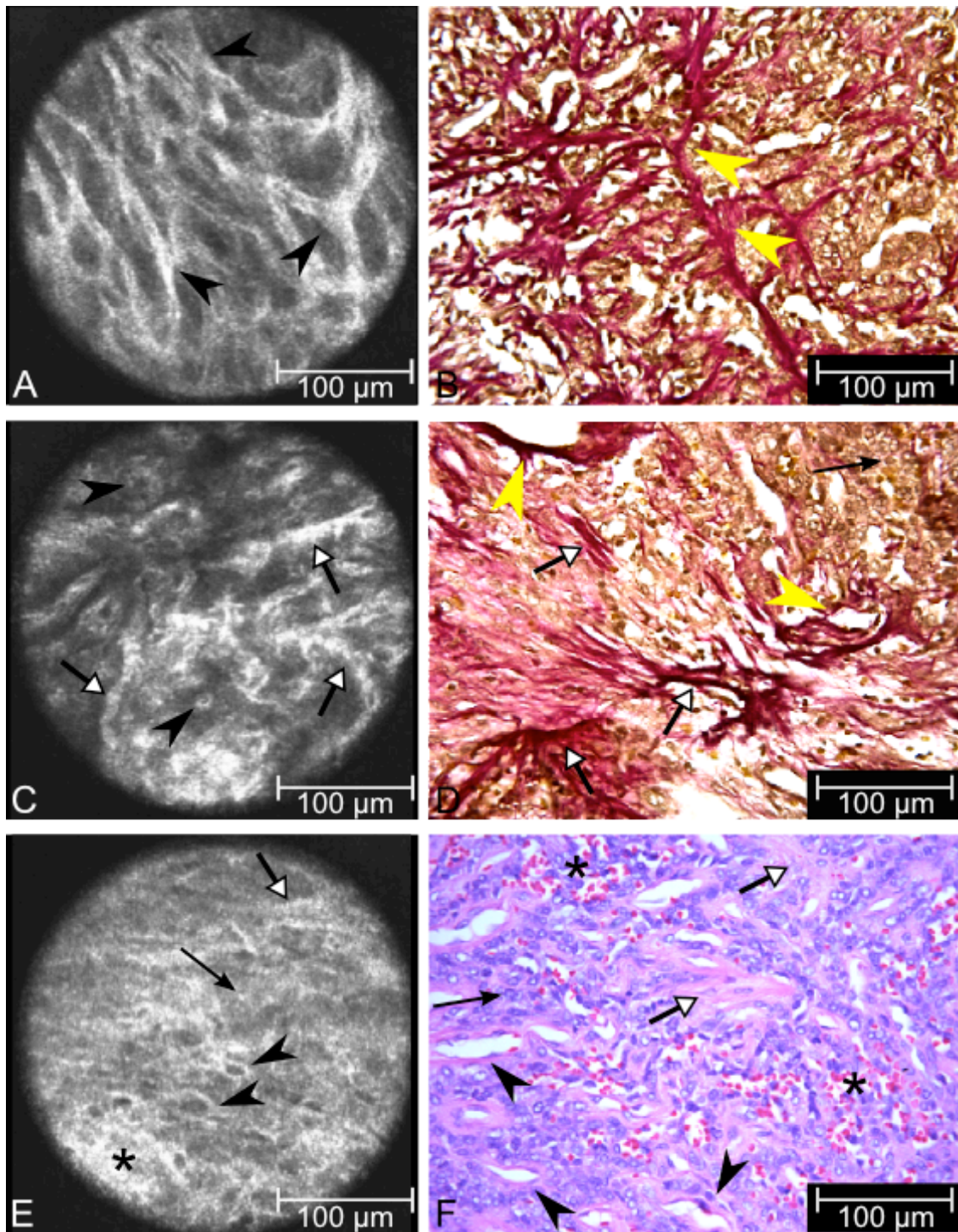


**Abbildung 24 Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III, Patient 5**

**A, B:** Zellvermehrtes Gewebe (Pfeil) mit mukoider zystischer Degeneration (leerer Pfeil). In der korrespondierenden Histologie ist sowohl eine streifige Faservermehrung (Pfeilspitze) zu erkennen, vereinbar mit einem dichten Netz aus verzweigten Kapillaren, als auch beginnende Gefäßproliferate mit aktivierten Endothelien. **C, D:** Locker strukturierte Tumormatrix (Sternchen) mit Mikrozysten. Die Honigwabenkomponente (Pfeil) kommt hier gut zum Ausdruck. Pfeilspitze: Gefäß im Querschnitt. Leerer Pfeil: Erythrozyten. Rechts im Bild ist eine Aufhellung der Zellen zu erkennen. Am ehesten durch eine andere Schnittebene verursacht. **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE-Färbung, Vergr. 40-fach.

### III.3.4 Hämangioperizytom

Im untersuchten Hämangioperizytom, ein Patient, 117 CLEM Bilder, sind typische Strukturen dieses zellreichen, isomorphzelligen und bindegewebigen Tumors zu sehen. Die geweihartig verzweigten Gefäße sind von Bindegewebe umgeben und lassen sich als fast weiße, stark verzweigte Strukturen darstellen (Abbildung 25 A). Das Retikulinfasernetzwerk zeigt eine ähnliche Helligkeit, aber eine andere Struktur als die Gefäße (Abbildung 25 C). Gefäße im Querschnitt imponieren als hellgraue Ringe (Abbildung 25 E). In der Histologie erscheinen diese aufgeschlitzt (Abbildung 25 F). Zellen sehen wir in diesen Bildern nicht.



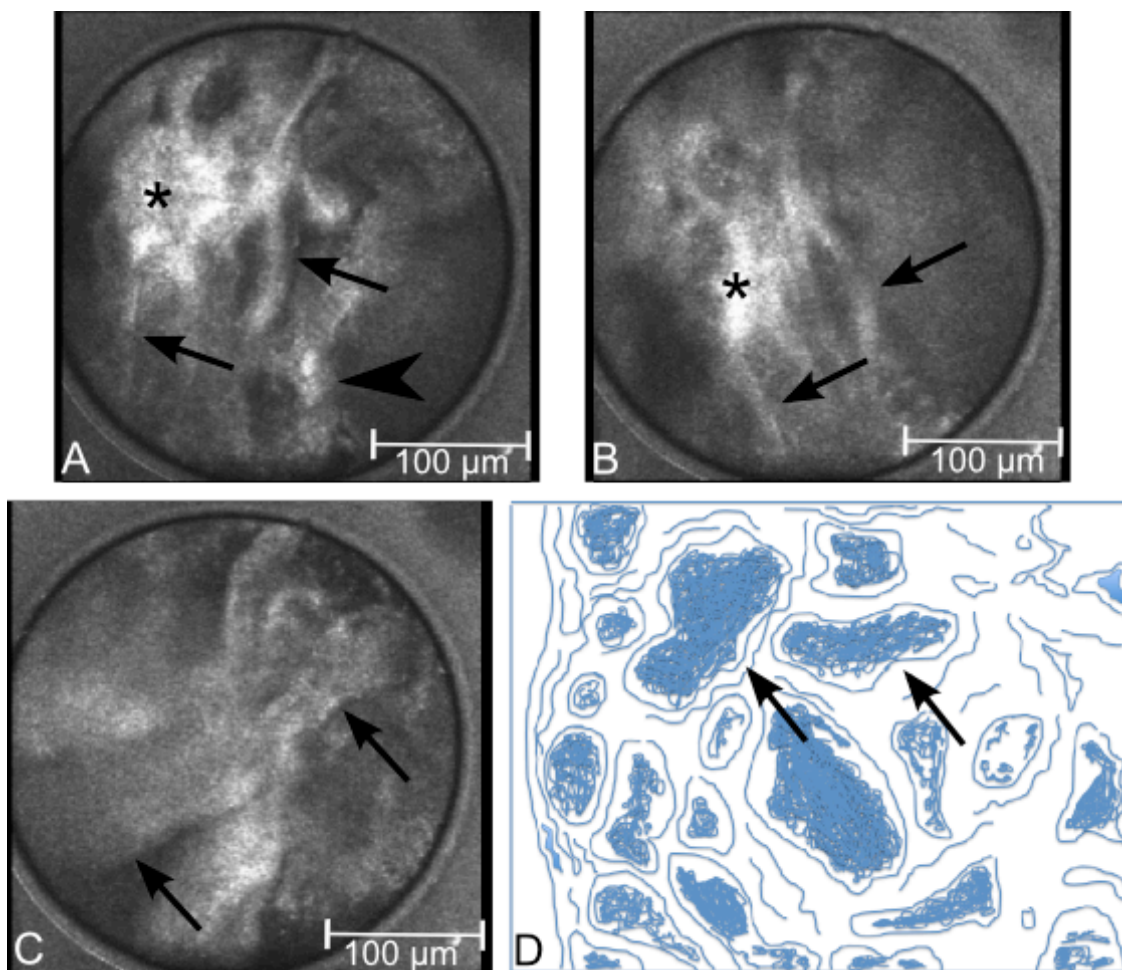
**Abbildung 25 Hämangioperizytom, Patient 2**

**A, B:** Geweihartige Verzweigung der Gefäße im Längsschnitt. Man erkennt Anteile eines zellreichen (Pfeil), relativ isomorphzelligen, eingebluteten (Sternchen), bindegewebigen (leerer Pfeil) Prozesses mit zahlreichen geweihartig verzweigten Gefäßen (Pfeilspitze). **C, D:** Starker Bindegewebsreichtum, vereinbar mit einem Retikulinfasernetzwerk, teilweise sehr stark perivaskulär ausgebildet. **E, F:** Stark vaskularisierte Matrix. Im Querschnitt erscheinen die Gefäße aufgeschlitzt und zeigen teilweise eine perivaskuläre Fibrose. **A, C, E:** CLEM 300x300 µm. **B, D, F:** Histologie. **B, D:** EvG- Färbung, **F:** HE- Färbung, Vergr. 40- fach.



### III.3.5 Kavernom

Zwei Patienten mit Kavernom wurden untersucht, 911 CLEM Bilder, Mittelwert 455,5 pro Patient. Die unregelmäßig geformten und unterschiedlich großen, sinusoidal erweiterten Gefäßräume dominieren als graues bis hellgraues Geflecht (Abbildung 26). Im CLEM sind massiv vermehrte Blutgefäße zu sehen, die sich wie ein Konglomerat zusammenlagern und spinnennetzartig in die Peripherie verlaufen. Intraluminale Thrombosen lassen sich als Konkrememente innerhalb der Gefäße darstellen (Abbildung 26 A). Bei den großkalibrigen Gefäßen ist eine eindeutige Epithelgrenze schwer auszumachen (Abbildung 26 C).



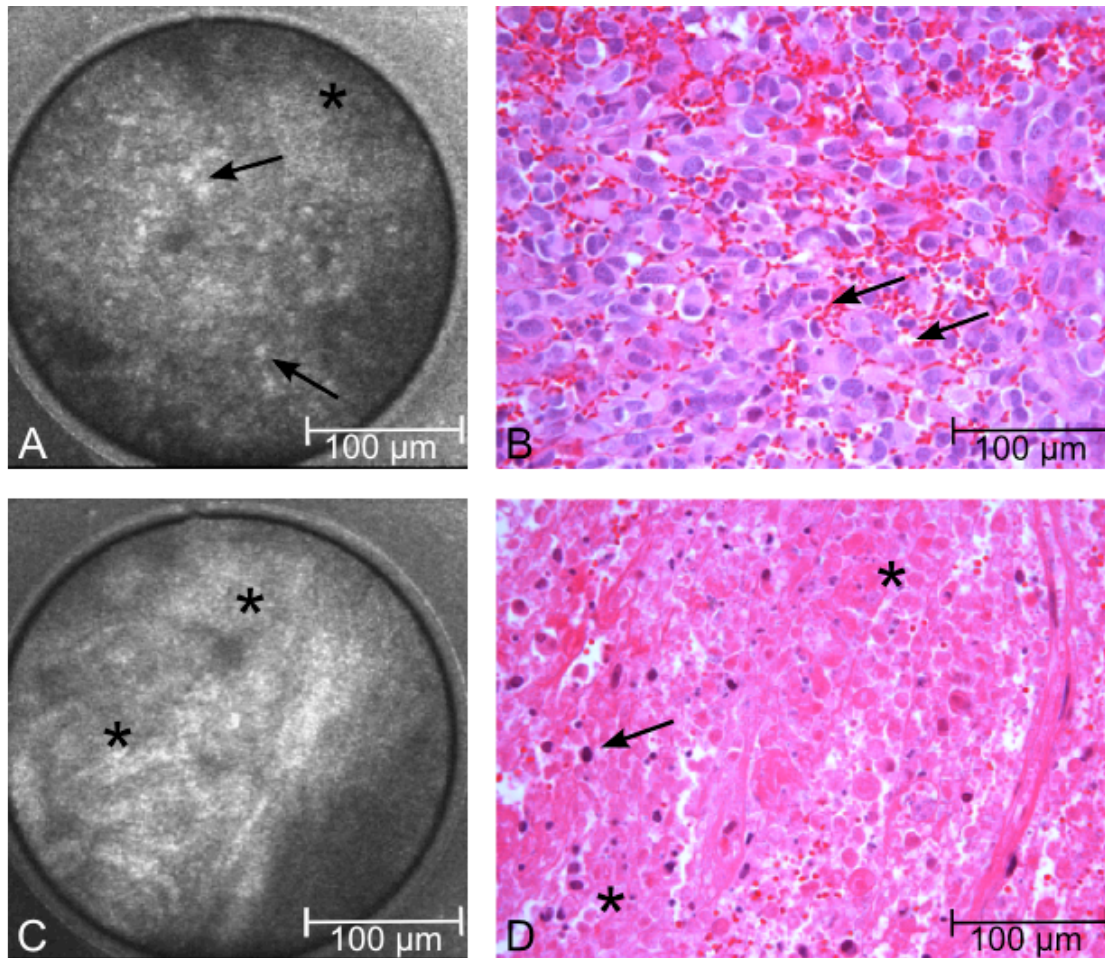
**Abbildung 26 Kavernom, Patient 31: Gefäße**

**A, B:** Gefäßkonglomerat (Sternchen) aus dem spinnennetzartig Gefäße (Pfeil) in die Peripherie verlaufen. Teilweise sind thrombosierte (Pfeilspitze) Gefäße zu sehen. **C:** Großkalibrige Gefäße (Pfeil). Bei den dünnwandigen Epithelräumen kann die Epithelgrenze nicht eindeutig identifiziert werden. **D:** Eng aneinander liegende, erweiterte Kapillargefäße (Pfeil), die von faserigem Bindegewebe umgeben sind. **A- C:** CLEM 300x300 µm. **D:** Schemazeichnung eines Kavernoms.



### III.3.6 Metastasen

Es wurden drei Patienten mit Hirnmetastasen untersucht, 1548 CLEM Bilder, Mittelwert 516 pro Patient. Bei der Metastase des Bronchialkarzinoms stellen sich die pleomorphen Zellen im CLEM als graue Strukturen mit zentral dunklem Nukleus dar (Abbildung 27 A). Nekrose zeigt sich als diffuses wolkiges Bild ohne Zellen (Abbildung 27 C).

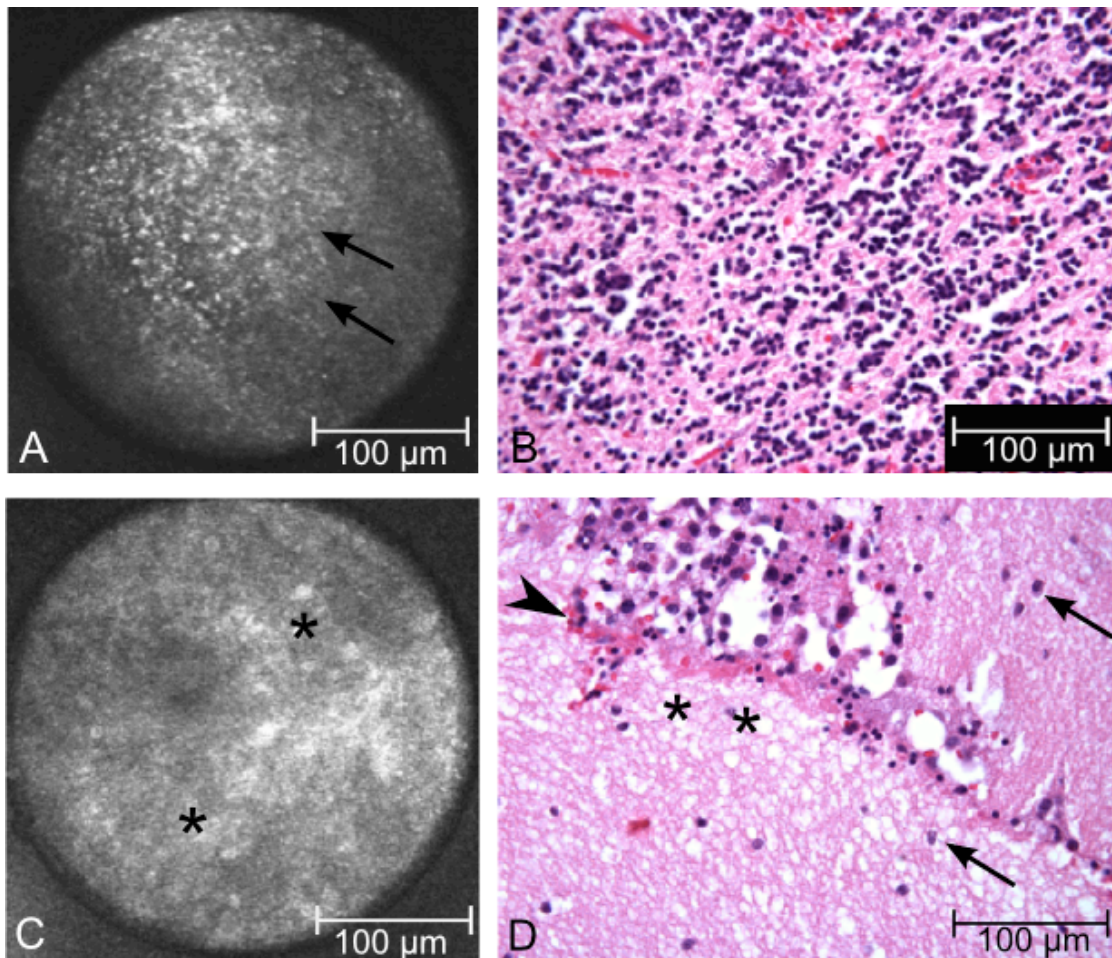


**Abbildung 27 Enddifferenzierte Karzinommetastase, aufgrund von Immunhistochemie am ehesten Metastase eines Bronchial Ca, Patient 28**

**A, B:** Man erkennt Anteile eines zellreichen (Pfeil), polymorphzelligen und –kernigen, epithelial differenzierten Prozess. In der Histologie sind relativ große homogene Zellen in eingeblutetem Gewebe zu sehen. **C, D:** Nekrotisch verändertes Gewebe (Sternchen) mit teilweise erhaltenen Tumorzellen. **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

Bei der cerebellären Metastase eines Mammakarzinoms sind die Zellen der Körnerschicht im CLEM als kleine fast weiße Pünktchen zu erkennen. Daneben fallen andere Zellen, wahrscheinlich Tumorzellen auf, die dunkler, größer und angedeutet einen Kern besitzen, auf (Abbildung 28 A). In der entsprechenden Histologie ist die Körnerzellschicht mit vereinzelt polymorphzelligen und –kernigen Tumorzellen, die epithelial differenziert sind, zu sehen (Abbildung 28 B). Nekrose stellt sich ebenfalls als

wolkiges kontrastarmes Bild dar. Das Gewebe ist locker strukturiert und es lassen sich stellenweise Zellen erkennen (Abbildung 28 C, D).



**Abbildung 28 Metastase Mamma Ca, Patient 6**

**A, B:** Zellreicher, in der Körnerschicht des Cerebellums liegender, polymorphzelliger und – kerniger epithelial differenzierter teils adenoid aufgebauter Prozess. **C, D:** Nekrose (Sternchen) mit dazwischenliegenden Zellen (Pfeil) und Erythrozyten (Pfeilspitze). **A, C:** CLEM 300x300 µm. **B, D:** Histologie, HE- Färbung, Vergr. 40- fach.

### III.4 Verblindete Analyse

Repräsentative konfokale Bilder (durchschnittlich 10 Bilder/Probe) der 35 Tumore und 4 gesunden Maushirne wurden einem Neuropathologen verblindet vorgelegt und von diesem beurteilt. Diese Verblindung soll als erster Eindruck dienen, wie ein Ungeübter, der die Methode weder kennt noch darin trainiert wurde, die konfokalen Bilder bewertet. Es erfolgte keine Analyse der Spezifität und Sensitivität.

Von den vier gesunden Maushirnen wurden drei als richtig gesund erkannt (75%). Als richtig pathologisch wurden 31 von 35 Tumoren bewertet (88,6%). Von den 16 glialen Hirntumoren wurden 12 als glial eingeschätzt (75%) und von den 19 nicht-glialen Tumoren wurden 8 richtig als nicht-glial beurteilt (42,1%).

## IV Diskussion

Die konfokale EndoMikroskopie erlaubt einen Einblick in die Neuroanatomie bis zur zellulären Ebene in Echt-Zeit für gesundes und pathologisches Gewebe in Mausmodellen und bei Patienten [7, 9, 12, 22, 23, 34, 41, 42, 49]. In der vorliegenden Studie wurden Gewebeproben von 35 Patienten mit unterschiedlichen Hirntumoren und vier gesunde Maushirne mittels CLEM untersucht. Dabei wurden die Proben weder mit Fluoreszenz noch mit anderen Biomarkern gefärbt. Für die Auswertung der Bilder spielte neben der Identifizierung und Differenzierung der unterschiedlichen Gewebeproben, auch die Malignitätseinstufung anhand der Richtlinien der WHO der verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle. Diese Informationen können zu einer Verbesserung der intraoperativen Entscheidungen beitragen, indem das CLEM eine erste Diagnoseeinschätzung zulässt und den Operateur dabei unterstützt innerhalb der Resektionshöhle das Tumervolumen zu detektieren als direkte Resektionskontrolle. Da keine Fluoreszenz oder andere Marker verwendet werden müssen, ist diese Methode auch für den Gebrauch in vivo geeignet und beeinflusst die anschließende histopathologische Aufarbeitung nicht.

Mit dem CLEM lässt sich sowohl die Gewebearchitektur als auch Zellen darstellen. Die klaren Schichten des Kleinhirnkortex können im murinen Hirngewebe visualisiert werden. Die gelegentlichen Probleme bei der Differenzierung beispielsweise zwischen Purkinjezellen und Neuronen im Kleinhirn kann einerseits durch Überlappungen und Anschnittphänomene von Zellen, Dendriten, Fasern oder Gefäßen bedingt sein. Andererseits können Unregelmäßigkeiten oder Bewegungsartefakte auf der Oberfläche des zu untersuchenden Gewebes die Qualität, Auflösung und Schärfe des CLEM negativ beeinflussen. Dennoch ist die teils klare Untergliederung des Kleinhirns, die in vielen Schnitten dargestellt werden konnte, charakteristisch und ermöglicht eine Gewebeidentifikation. In Kleinhirnen von Ratten konnte mit topischer Gabe von Acriflavin die entsprechende Anatomie dargestellt werden [9].

In unserer Studie wollten wir die These überprüfen ob eine Diagnosestellung mithilfe des CLEMs möglich ist. Das CLEM erlaubte es das Gewebe zu charakterisieren, es wurden zahlreiche typische Befunde identifiziert.

Aufgrund der Relevanz und der Anzahl der untersuchten Proben setzen wir unseren Schwerpunkt in der Diskussion auf das Meningeom und das GBM.

Das CLEM ermöglicht einen umfassenden Einblick in die Gewebearchitektur des Meningeoms. Neben Psammomkörper lassen sich Wirbelformationen, Bindegewebe und Kollagenfaserbündel deutlich und sicher reproduzierbar darstellen. Das

Meningeom bildet einen pseudosynzytialen Zellverband aus, bei dem sich keine Zellgrenzen erkennen lassen. So gestaltet es sich in den histologischen Färbungen mitunter schwierig Zellgrenzen darzustellen. Folglich ist zu erwarten, dass mit dem CLEM ähnliche Probleme auftreten und einzelne Zellen nur gelegentlich identifiziert werden können. Mit den CLEM Informationen zur Gewebearchitektur lässt sich das Meningeom zum Teil nach histologischer Typenvielfalt einteilen (meningotheliales, fibröses, psammomatöses und Transitionalzell- Meningeom). In anderen Studien, die mit der topischen oder intravenösen Gabe von Fluoreszenz arbeiteten, wurde solch eine Differenzierung nicht erwähnt [9, 49].

Die Diagnose eines Glioblastoms basiert typischerweise nicht auf der Identifikation von bestimmten Zellen, sondern auf die zusammengesetzte Gewebestruktur und beinhaltet das Vorliegen von anaplastischen glialen Zellen, einer erhöhten Mitoserate, Tumornekrose, in Abgrenzung zur Strahlennekrose oder hypoxischen Nekrose, und/oder Gefäßproliferation. Es gelang, polymorphzellige zellvermehrte Prozesse und flächenhafte Nekrose, sowie kaliberstarke Gefäße zu erkennen. Der Nachweis einer typischen Pseudopalisadenbildung gelang uns nicht, allerdings muss hier eingeräumt werden, dass in den jeweiligen histopathologischen Präparaten diese ebenfalls nicht gesehen wurde. In anderen Studien konnten Pseudopalisaden visualisiert werden [7, 49]. Mit unserer Methode gelang es, Zellkerne darzustellen, Mitosen konnten wir in der Regel nicht sicher identifizieren. Eine Malignitätseinschätzung gelang anhand erhöhter Zellularität/ Zelldichte und flächenhafter Nekrose. Mit der topischen oder intravenösen Applikation von Acriflavin können bei Gliomen eine erhöhte Zellularität, Variationen an Kerngröße und -form, sowie Mitosen gesehen werden [9, 42, 49]. Die Details bezüglich der Kerne geht auf das Acriflavin zurück. Es wird intrazellulär von metabolisch aktiven Nuclei aufgenommen, in die dsDNA integriert und zum Anfärben von Interphasekernen und mitotischen Zellen verwendet. Daher heben sich diese Zellstrukturen hervor und es lässt eine Aussage zur mitotischen Aktivität zu. Ein Problem kann hier sein, dass ähnlich wie bei 5-ALA niedriggradig maligne Gliome mit dieser Methode nicht adäquat erfasst werden. Außerdem färben sich nicht die kompletten Zellen an, sodass das Kern-Zytoplasma-Verhältnis fehlt.

Eine Malignitätseinstufung anhand der histologischen Bewertungskriterien nach den Richtlinien der WHO lässt sich anhand der Untersuchungen von Gewebe mit CLEM teilweise vornehmen. Gut darstellbar sind Nekrose und massive Blutgefäßvermehrung. Weniger gut lassen sich Kernpolymorphie und Mitosen erkennen. Außerdem können weitere Struktureigenschaften wie Kalk, Bindegewebe und Retikulinfasern erfasst werden.

Die Retikulinfasern sind beispielsweise ein wichtiges Unterscheidungskriterium vom PXA zum GBM. Mit den Unterscheidungsmerkmalen Retikulinfasern, Nekrose und Mitosen können diese beiden Tumorentitäten in der histologischen Routinefärbung voneinander unterschieden werden. Dementsprechend ist die Differenzierung PXA zu GBM bedingt mit dem CLEM möglich.

Das anaplastische Oligoastrozytom lässt sich in der vorliegenden Studie mit den konfokalen Bildern nicht vom Glioblastom unterscheiden, da es ebenfalls Kriterien der erhöhten Malignität aufweist. Es ist weder eine genaue Identifizierung der Zellkomponenten möglich noch lässt sich die genaue mitotische Aktivität erschließen.

Die Tumoren mit oligodendroglialer Komponente zeigten gehäuft eine eher wolkige Struktur. Um zwischen astrozytärer und oligodendroglialer Komponente eindeutig differenzieren zu können, müsste eine Studie unter dieser speziellen Fragestellung mit einer höheren Anzahl an Patienten durchgeführt werden. Da bei den gemischten Gliomen unterschiedliche Zellstrukturen zu erkennen sind, ist eine Differenzierung der Zellkomponenten durchaus denkbar.

Um belastbare Angaben zur Differenzierung der Tumorentität mittels CLEM zu tätigen, sind in dieser Studie die Anzahlen der einzelnen Tumorgruppen zu gering. Es lässt sich keine Aussage zur Spezifität oder Sensitivität treffen.

Es stellt sich grundsätzlich die Frage, warum wir bestimmte Strukturen erkennen können und andere Strukturen vergleichbarer Größe nicht. In einigen CLEM Aufnahmen war die Darstellung kleinerer, rundlicher Strukturen im Inneren der Zelle, die wir dem Zellkern zuordnen, möglich. In anderen Aufnahmen war eine ähnlich detaillierte Auflösung nicht zu erreichen. Gewebe mit klaren Strukturen bzw. Faserverläufen, wie z. B. Axonbündel, kamen im Gegensatz zu einzelnen Nervenfasern deutlicher zur Darstellung. Während Nervenfaserbündel geordnete Strukturen darstellen, zeigt sich das faserarme Gewebe mit unterschiedlichen Zelltypen wie Gliazellen und Pyramidenzellen ungeordnet. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Hypothese, dass die Reflexion des Laserstrahls durch ungeordnete Gewebe gestört wird, was zu einer geringeren Bildqualität und -auflösung durch Überlagerungen und diffuser Reflexion der Laserstrahlen führt. Ebenso wurde in weichem, ödematösem und eingeblutetem Gewebe eine minderwertige Auflösung beobachtet. Ein weiteres Problem waren Artefakte, die durch Rauschen oder Luftblasen entstanden. Da bei dieser Methode zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild entsteht, ist es wichtig das Endoskop vorsichtig zu bewegen. In vivo kann dies durch Blutfluss, Atmung und Herzkreislauf zu Problemen in der Auflösung und Bewegungsartefakten führen [7]. Es ist zu erproben, ob ein Medium zwischen Gewebe



und Endoskop, wie es beispielsweise in der Sonografie üblich ist, zu einer Bildverbesserung führen könnte.

Gefäße größeren Kalibers sind recht eindeutig darstellbar. Es ist schwieriger kleinere Gefäße wie Kapillaren sicher von Nervenfasern oder Bindegewebsfasern zu unterscheiden. Aufgrund der einschichtigen Epithelschicht der zarten Kapillaren gelingt es auch in der Histologie selten Kapillaren in den Schnittbildern zu treffen und zu erkennen. Die kleinsten Strukturen, die wir mittels CLEM zuordnen konnten waren Erythrozyten, die einen Durchmesser von 7µm aufweisen. Kleinere Strukturen lassen sich aktuell nicht sicher zuordnen. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die rechnerische Auflösung von 2µm faktisch nicht möglich ist, oder aber durch Artefakte sehr störanfällig ist.

In anderen Studien wurden Gefäße, Blutfluss und Kapillaren durch Applikation von Fluoreszein i.v. dargestellt [7, 9, 42]. Wie lange die Gefäße mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden, oder ob es sich um eine dynamische Untersuchung handelt, bei der das fließende Fluoreszenzmittel visualisiert wird, ist aus den Studien nicht ersichtlich.

Vergleicht man die technischen Details der verschiedenen Studien zur konfokalen Mikroskopie miteinander, fällt auf, dass die Pixelzahl, die Bildrate und die Wellenlänge unterschiedlich ist. Die Bildauflösung unseres Endoskops beträgt 384x384 Pixel bei einer Bildrate von 40 Bildern pro Sekunde. In anderen Studien betrug die Pixelzahl 1024x1024 Pixel bei einer Bildrate von 0,8 Bildern pro Sekunde oder 1024x512 Pixel bei einer Bildrate von 1,6 Bildern pro Sekunde. Die Wellenlänge des verwendeten Laserstrahls unterscheidet sich je nach verwendeten Fluoreszenzmittel. In der vorliegenden Studie betrug die Wellenlänge konstant 633 nm, da keine Fluoreszenz verwendet wurde. Durch eine hohe Bildrate entsteht ein Echtzeit Bild, mit geringerer Pixelzahl. Es stellt sich die Frage, ob die Bildqualität durch Erhöhung der Pixelzahl positiv beeinflusst werden könnte. Allerdings ist zu vermuten, dass die Bildrate dadurch verringert wird und es zu Störfaktoren wie beispielsweise Rauschen führen könnte.

Ergänzend sinnvoll bei der Auswertung der konfokalen Bilder mit der Histologie wären sehr kleine, dünne und markierte Tumorproben, um die identische Schnittfläche miteinander vergleichen zu können. Aktuell ist ein Nachteil, dass eine relevante Eindringtiefe in unter der Oberfläche gelegene Schichten nicht möglich ist, sondern erst die obere Schicht abgetragen werden muss. Es handelt sich um eine zweidimensionale Untersuchungsmethode, die auf die Verwendung an der Gewebeoberfläche begrenzt ist. Die Schnittebene bestimmt den Anschnitt von Zellen und Strukturen.



Im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop lässt sich beim CLEM die Vergrößerung nicht variieren. Damit ist weder eine Übersichtsaufnahme des Präparats noch eine Detailaufnahme möglich. Der Bildausschnitt beträgt immer 300 x 300 µm, was vom Maßstab einer 40-fachen Vergrößerung im Lichtmikroskop entspricht. Aus diesem Grund muss einerseits damit gerechnet werden, dass einige Strukturen in dieser Vergrößerung nicht gesehen werden können. Andererseits kann die Orientierung innerhalb des Gewebes teilweise erschwert sein.

In der Pilotstudie kann gezeigt werden, dass mithilfe des CLEM eine Differenzierung der verschiedenen Gewebe möglich ist, was als Grundvoraussetzung für eine Resektionskontrolle dient. In einer Hauptstudie, die im neurochirurgischen Operationssitus erfolgen sollte, kann folgend der Schwerpunkt auf die Identifikation von Tumorgrenzen gelegt werden. Da wir Bindegewebe erkennen können, ist es durchaus denkbar eine bindegewebige Abgrenzung der Metastasen in vivo zu identifizieren, sodass eine Resektion in toto durch das CLEM unterstützt werden kann. Eine weitere Frage ist, ob die diffuse Infiltration der Gliome im Hirngewebe visualisiert werden kann. Andere Studien haben die Tumorgrenzen dort festgelegt, wo das Fluoreszenzsignal aufgehoben war [7, 9]. Dafür muss allerdings sichergestellt sein, dass gesundes Hirngewebe keine Fluoreszenz aufnimmt. Das diffuse Wachstum der niedrigmalignen Gliome kann mit 5-ALA makroskopisch nicht dargestellt werden. Die Kombination aus 5-ALA und konfokaler Mikroskopie lässt dies auf zellulärer Ebene allerdings zu [41]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie aktuell keine Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen, keine Darstellung von Mitosen, Nekrosen, Gefäßen oder anderer Strukturen zulässt.

Ausblickend kann erwartet werden, dass das CLEM bei Verwendung in situ den Operateur bei der Entscheidung unterstützen kann, die Resektion zu beenden oder fortzuführen. Dabei soll mit dem CLEM nicht der gesamte Tumor untersucht werden, sondern gezielt in kritischen Bereichen eingesetzt werden. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass bei den Gliomen, aufgrund ihres diffusen Wachstums, keine komplette Zytoreduktion möglich ist. Eine Tumorgrenze kann weder mit dem CLEM noch histologisch bestimmt werden.

Die kontrollierte Gewebeentnahme aus dem Tumorrandbereich mittels CLEM wäre zusätzlich ein Zeit- und Arbeitersparnis für Neuropathologen und Neurochirurgen. Intraoperativ kann Gewebe aus den Tumorgrenzen identifiziert und zum Schnellschnitt geschickt werden. Auch die gezielte Entnahme vitaler repräsentativer Tumorzellen kann die Diagnosestellung für den Neuropathologen vereinfachen. Vor allem bei

hochgradig malignen Tumoren mit vielen nekrotischen Arealen ist die Entnahme vitaler Tumorzellen bedeutend.

Die intratumorale Heterogenität stellt ein diagnostisches Problem für die Histologie dar [25]. Vor allem bei kleinen Gewebeproben, wie sie häufig bei Biopsien oder Teilresektionen nur möglich sind, ist es von größter Bedeutung die korrekte Tumorentität für die weitere Therapieplanung zu diagnostizieren. Dies stellt für den Neuropathologen eine Herausforderung dar [52]. Mithilfe des CLEMs kann die Biopsie Entnahme unterstützt werden, indem zielsicher die Läsion getroffen wird und genügend repräsentatives Tumorgewebe für die Neuropathologie zur Verfügung steht. Die Entnahme hochwertiger Gewebeproben sorgt für einen effizienten Arbeitsfluss, der auch im Rahmen der Telepathologie genutzt werden kann [14].

Für eine Diagnosestellung ohne Materialentnahme, muss es dem CLEM möglich sein neben der Anwendung der WHO-Klassifikation, auch die Tumorentität zu bestimmen. Nicht jedes Krankenhaus verfügt über eine Neuropathologie. Um intraoperativ trotzdem eine Diagnose zu erhalten, kann die Telemedizin durch die Anwendung des CLEMs erweitert werden. Die konfokalen Bilder könnten intraoperativ mittels Teleradiologie zu einem Neuropathologen oder Experten zur Diagnosestellung verschickt werden.

Für die chirurgische intraoperative Sichtweise ist die exakte Tumordiagnose unter Umständen weniger relevant, als die Identifikation von pathologisch und nicht-pathologisch verändertem Gewebe. Sehr schmale Tumorrückstände können alleine mit der Neuronavigation nicht exakt detektiert werden [33]. Um trotzdem eine Zytoreduktion zu erreichen wurde die Kombination mit 5-ALA erprobt [8]. Diese Kombination ist für höhergradig maligne Gliome möglich.

Intraoperativer Ultraschall besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität vor der Resektion. Nachteilig ist, dass während der Resektion die Spezifität durch Artefakte wie Luftblasen, Blut und die raue Oberfläche der Resektionshöhle erheblich sinkt. Nach der Resektion sinkt die Sensitivität, da es nicht möglich ist Tumorreste in der Operationshöhle zu erfassen, sodass keine Resektionskontrolle möglich ist [37].

Perspektivisch ist ein Einblick in die Neuroanatomie bis zur zellulären Ebene mittels konfokaler EndoMikroskopie ohne Fluoreszenz möglich. Es gelingt eine Einschätzung über die Gewebearchitektur zu treffen, ob es sich um einen sehr zellreichen, nekrotischen, gefäßreichen, fokal aufgelockerten oder eher bindegewebigen Prozess handelt. Weder eine eindeutige Identifizierung von Tumorzellen noch die Darstellung von Tumorgrenzen bei den nicht-glialen Tumoren, ist uns in der vorliegenden Arbeit gelungen. Des Weiteren ist eine Malignitätseinstufung anhand der Morphologie und der

Richtlinien der WHO nur anhand von Zellvermehrung, ungeordneter Strukturen, Nekrose und großkalibriger Gefäßproliferation möglich.

Während der Studie ließ sich eine Lernkurve erkennen sowohl bei der Untersuchung wie auch Interpretation der Bilder. Mit der Erfahrung wurde die Bildqualität durch Optimierung der Fokuseinstellung optimiert und das untersuchte Gewebe konnte schonend untersucht werden. Ein ungeübter Untersucher hingegen könnte das Gewebe durch zu viel Druck beschädigen, sodass die Tumorproben für die Pathologie von geringerer Qualität sind und die Diagnosestellung beeinträchtigt würde. In situ könnte es zu Verletzungen des Gehirngewebes kommen.

Diese Technik wird durch ihre geringe Auflösung und dadurch erschwerte Beurteilbarkeit der anatomischen Strukturen limitiert. Bestimmte Strukturen lassen sich hervorheben, andere nicht. Die histologische Beurteilung ist mit dieser Methode derzeit nicht zu ersetzen. Insbesondere unter Berücksichtigung der Immunhistochemie und des MGMT- Promotormethylierungsstatus, was für Prognose und weitere Therapieplanung des Patienten essentiell ist. Aufgrund der Vorteile des CLEMs wie z. B. die einfache Handhabung eines geübten Untersuchers, risikoarme Untersuchung für den Patienten, relativ preisgünstige und Ressourcen sparende Methode, ist es trotzdem sinnvoll weitere Studien durchzuführen. In einer Hauptstudie zur Prüfung der Verwendung des CLEMs in situ zur Bestimmung der Tumorgrenzen, sollte ein verbessertes Endoskop verwendet werden, mit dem weniger Artefakte und eine höhere Bildqualität erreichbar sind.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die konfokale Mikroskopie eine Methode mit viel Potenzial ist, dessen Möglichkeiten und Grenzen noch nicht vollends erforscht sind.

## V Literaturverzeichnis

1. Anderson JC, McFarland BC, Gladson CL (2008) New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. *Expert Rev Mol Med*, vol 10 England, p e23
2. Backer-Grondahl T, Moen BH, Torp SH (2012) The histopathological spectrum of human meningiomas. *Int J Clin Exp Pathol* 5:231-242
3. Bataille B, Delwail V, Menet E et al. (2000) Primary intracerebral malignant lymphoma: report of 248 cases. *J Neurosurg* 92:261-266
4. Cohen AL, Holmen SL, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:345
5. Crocetti E, Trama A, Stiller C et al. (2012) Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*
6. Ellis TL, Neal MT, Chan MD (2012) The role of surgery, radiosurgery and whole brain radiation therapy in the management of patients with metastatic brain tumors. *Int J Surg Oncol* 2012:952345
7. Eschbacher J, Martirosyan NL, Nakaji P et al. (2012) In vivo intraoperative confocal microscopy for real-time histopathological imaging of brain tumors. *J Neurosurg* 116:854-860
8. Eyupoglu IY, Hore N, Savaskan NE et al. (2012) Improving the extent of malignant glioma resection by dual intraoperative visualization approach. *PLoS One*, vol 7 United States, p e44885
9. Foersch S, Heimann A, Ayyad A et al. (2012) Confocal laser endomicroscopy for diagnosis and histomorphologic imaging of brain. *PLoS One* 7:e41760
10. Goetz M, Deris I, Vieth M et al. (2010) Near-infrared confocal imaging during mini-laparoscopy: a novel rigid endomicroscope with increased imaging plane depth. *J Hepatol* 53:84-90
11. Goetz M, Kiesslich R (2008) Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res* 28:353-360
12. Hezel M, Ebrahimi F, Koch M et al. (2012) Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for. *Micron* 43:1031-1038
13. Jakola AS, Gulati S, Nerland US et al. (2011) Surgical resection of brain metastases: the prognostic value of the graded prognostic assessment score. *J Neurooncol* 105:573-581
14. Kayser K (2012) Introduction of virtual microscopy in routine surgical pathology-a hypothesis. *Diagn Pathol* 7:48
15. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215-225; discussion 226-219
16. Kleihues P, World Health Organization. (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system : the WHO classification of tumours of the nervous system presented in this book reflects the view of a Working Group that convened for an editorial and consensus conference in Lyon, France, July 27 - 30, 1999. IARC Press Lyon
17. Krammer B, Plaetzer K (2008) ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci* 7:283-289
18. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O et al. (2011) Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol*, vol 13 United States, pp 1339-1348

19. Kuhnt D, Ganslandt O, Schlaffer SM et al. (2011) Quantification of glioma removal by intraoperative high-field magnetic resonance imaging: an update. *Neurosurgery* 69:852-862; discussion 862-853
20. Leighton C, Fisher B, Bauman G et al. (1997) Supratentorial low-grade glioma in adults: an analysis of prognostic factors and timing of radiation. *J Clin Oncol* 15:1294-1301
21. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109
22. Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM et al. (2011) Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green. *J Neurosurg* 115:1131-1138
23. Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM et al. (2011) Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg*
24. Miller D, Heinze S, Tirakotai W et al. (2007) Is the image guidance of ultrasonography beneficial for neurosurgical routine? *Surg Neurol* 67:579-587; discussion 587-578
25. Moskopp D (2005) *Neurochirurgie : Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk ; mit 206 Tabellen*. Schattauer Stuttgart {[u.a.]}
26. Nayak L, Lee EQ, Wen PY (2012) Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep* 14:48-54
27. Newton HB, Ray-Chaudhury A, Cavaliere R (2006) Brain tumor imaging and cancer management: the neuro-oncologists perspective. *Top Magn Reson Imaging*, vol 17 United States, pp 127-136
28. Nimsky C (2011) Intraoperative MRI in glioma surgery: proof of benefit? *Lancet Oncol*, vol 12 England, pp 982-983
29. Nimsky C, Fujita A, Ganslandt O et al. (2004) Volumetric assessment of glioma removal by intraoperative high-field magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 55:358-370; discussion 370-351
30. Nimsky C, Ganslandt O, Hastreiter P et al. (2005) Preoperative and intraoperative diffusion tensor imaging-based fiber tracking in glioma surgery. *Neurosurgery* 56:130-137; discussion 138
31. Nimsky C, von Keller B, Schlaffer S et al. (2009) Updating navigation with intraoperative image data. *Top Magn Reson Imaging*, vol 19 United States, pp 197-204
32. Nossek E, Korn A, Shahar T et al. (2011) Intraoperative mapping and monitoring of the corticospinal tracts with neurophysiological assessment and 3-dimensional ultrasonography-based navigation. *Clinical article. J Neurosurg* 114:738-746
33. Panciani PP, Fontanella M, Schatlo B et al. (2012) Fluorescence and image guided resection in high grade glioma. *Clin Neurol Neurosurg* 114:37-41
34. Peyre M, Clermont-Taranchon E, Stemmer-Rachamimov A et al. (2013) Miniaturized Handheld Confocal Microscopy Identifies Focal Brain Invasion in a. *Brain Pathol*
35. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G et al. (2008) Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro Oncol* 10:1025-1034
36. Roszkowska AM, Aragona P (2011) Corneal microstructural analysis in weill-marchesani syndrome by in vivo confocal microscopy. *Open Ophthalmol J* 5:48-50
37. Rygh OM, Selbekk T, Torp SH et al. (2008) Comparison of navigated 3D ultrasound findings with histopathology in subsequent phases of glioblastoma resection. *Acta Neurochir (Wien)* 150:1033-1041; discussion 1042
38. Sanai N, Berger MS (2008) Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*, vol 62 United States, pp 753-764; discussion 264-756

39. Sanai N, Berger MS (2009) Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection. *Neurotherapeutics*, vol 6 United States, pp 478-486
40. Sanai N, Chang S, Berger MS (2011) Low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg* 115:948-965
41. Sanai N, Snyder LA, Honea NJ et al. (2011) Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. *J Neurosurg* 115:740-748
42. Sankar T, Delaney PM, Ryan RW et al. (2010) Miniaturized handheld confocal microscopy for neurosurgery: results in an experimental glioblastoma model. *Neurosurgery*, vol 66 United States, pp 410-417; discussion 417-418
43. Sant M, Minicozzi P, Lagorio S et al. (2011) Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int J Cancer*
44. Schlosser HG, Suess O, Vajkoczy P et al. (2010) Confocal neurolasermicroscopy in human brain - perspectives for neurosurgery on a cellular level (including additional comments to this article). *Cen Eur Neurosurg* 71:13-19
45. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C et al. (2010) Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107:799-807; quiz 808
46. Schulz C, Waldeck S, Mauer UM (2012) Intraoperative image guidance in neurosurgery: development, current indications, and future trends. *Radiol Res Pract* 2012:197364
47. Senft C, Bink A, Franz K et al. (2011) Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*, vol 12. 2011 Elsevier Ltd England, pp 997-1003
48. Sharma P, Meining AR, Coron E et al. (2011) Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: final results of an international multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 74:465-472
49. Snuderl M, Wirth D, Sheth SA et al. (2013) Dye-enhanced multimodal confocal imaging as a novel approach to intraoperative diagnosis of brain tumors. *Brain Pathol* 23:73-81
50. Solheim O, Selbekk T, Jakola AS et al. (2010) Ultrasound-guided operations in unselected high-grade gliomas--overall results, impact of image quality and patient selection. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1873-1886
51. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T et al. (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7:392-401
52. Tilgner J, Herr M, Ostertag C et al. (2005) Validation of intraoperative diagnoses using smear preparations from stereotactic. *Neurosurgery* 56:257-265; discussion 257-265
53. Toda M (2008) Intraoperative navigation and fluorescence imagings in malignant glioma surgery. *Keio J Med* 57:155-161
54. Utsuki S, Oka H, Sato S et al. (2007) Histological examination of false positive tissue resection using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence guidance. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47:210-213; discussion 213-214
55. Weller M, Stupp R, Hegi ME et al. (2012) Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*, vol 14 Suppl 4 England, pp iv100-108
56. Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G et al. (2010) 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer* 116:1545-1552
57. Yan H, Parsons DW, Jin G et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360:765-773



## VI Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Konfokales EndoMikroskop .....	9
Abbildung 2 Prinzip der Scannereinheit .....	10
Abbildung 3 Strahlengang in einem konfokalen EndoMikroskop .....	11
Abbildung 4 Fokus- Objekt Abstand .....	12
Abbildung 5 Untersuchungsvorrichtung A Zusammengesteckt B Auseinandergesteckt.....	12
Abbildung 6 Screenshot intraoperative MR- Navigation bei Glioblastomresektion .....	14
Abbildung 7 Auswahl typischer Artefakte .....	16
Abbildung 8 Kleinhirn, Maus: Feinbau des Cortex cerebelli.....	18
Abbildung 9 Kleinhirn, Maus: Marklager.....	19
Abbildung 10 Großhirn, Maus Cortex cerebri.....	21
Abbildung 11 Großhirn, Maus: Hemisphären in koronarer Schnittebene.....	22
Abbildung 12 Großhirn, Maus: Marklager .....	23
Abbildung 13 Großhirn, Maus: Corpus callosum.....	24
Abbildung 14 Meningeom. Unterschiedliche Darstellung von Psammomkörper.....	29
Abbildung 15 Meningeom: Wirbelformation und Retikulinfasernetzwerk. ....	31
Abbildung 16 Meningeom, Dura mater.....	31
Abbildung 17 Glioblastom: Tumorzellen.....	33
Abbildung 18 Glioblastom: Nekrose .....	35
Abbildung 19 Gefäßproliferate bei Glioblastom.....	36
Abbildung 20 Glioblastom: CLEM Bilder aus unterschiedlichen Tumorlokalisationen .....	38
Abbildung 21 Pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II .....	39
Abbildung 22 Oligoastrozytom WHO Grad II.....	41
Abbildung 23 Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III .....	42
Abbildung 24 Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III .....	43
Abbildung 25 Hämangioperizytom .....	45
Abbildung 26 Kavernom: Gefäße .....	46
Abbildung 27 Enddifferenzierte Karzinommetastase .....	47
Abbildung 28 Metastase Mamma Ca .....	48

## VII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Untersuchtes Maushirngewebe .....	13
Tabelle 2 Strukturelle und morphologische Bewertungskriterien .....	15
Tabelle 3 Histologische Bewertungskriterien nach den Richtlinien der WHO .....	15
Tabelle 4 Patientenkollektiv.....	26
Tabelle 5 Glioblastom: Vergleich der Gewebestrukturen im CLEM und Histologie .....	37

## **VIII Persönlicher Anhang**

### **VIII.1 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren an der Phillips-Universität in Marburg:

Barth

Bartsch

Basler

Bauer

Baum

Becker

Bohlander

Cetin

Czubayko

Del Rey

Feuser

Fuchs-Winkelmann

Görg

Gress

Grundmann

Grzeschik

Hertl

Höffken

Hofmann

Hoyer

Hundt

Kann

Kircher

Klingmüller

Klose

Koolmann

Kühnert

Lill

Löffler

Lohoff

Maier

Maisch  
Meissner  
Moll  
Moosdorf  
Mueller  
Mutters  
Neubauer  
Nimsky  
Oertel  
Oliver  
Pagenstecher  
Plant  
Preisig-Müller  
Ramaswamy  
Renz  
Röhm  
Ruchholtz  
Sahmland  
Schäfer  
Schmidt  
Schulze  
Seitz  
Sekundo  
Steiniger  
Vogelmeier  
Wagner  
Werner  
Westermann  
Weihe  
Wulf

## VIII.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ch. Nimsky, sowie meiner Betreuerin Frau Dr. med. B. Carl für die Überlassung des Themas, die wertvollen fachlichen Anregungen, die Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Geduld, die sie mir trotz Belastung in Klinik und Forschung entgegenbrachten.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. M. Hofer, der mir zum Verständnis der Neuropathologie verhalf und mir wichtige sachliche Hinweise gab.

Herrn Dr. P. Solleder der Firma Karl Storz GmbH danke ich für die zur Verfügungstellung des konfokalen EndoMikroskops und den technischen Support.

Mein persönlicher Dank gilt  
meinen Eltern und Geschwistern für ihre uneingeschränkte, liebe- und humorvolle  
Unterstützung  
und Daniel.

### VIII.3 Publikationen

Carl B., Schodrowski J., Hofer M.J., Kappus C., Nimsy C. Non-fluorescence confocal laserendomicroscopy in neurosurgery: an intraoperative tool for tumor classification and resection control?“, *Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in Leipzig, 13.-16. Juni 2012.*